

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Kenzo YOKOZEKI, et al.

GAU:

SERIAL NO: NEW APPLICATION

EXAMINER:

FILED: HERewith

FOR: METHOD FOR PRODUCING TRIPEPTIDES AND/OR PEPTIDES LONGER THAN TRIPEPTIDES

REQUEST FOR PRIORITY

COMMISSIONER FOR PATENTS
ALEXANDRIA, VIRGINIA 22313

SIR:

- ☒ Full benefit of the filing date of International Application PCT/JP03/09466, filed July 25, 2003, is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §120.
- ☐ Full benefit of the filing date(s) of U.S. Provisional Application(s) is claimed pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119(e):
- | <u>Application No.</u> | <u>Date Filed</u> |
|--|-------------------|
| <input checked="" type="checkbox"/> Applicants claim any right to priority from any earlier filed applications to which they may be entitled pursuant to the provisions of 35 U.S.C. §119, as noted below. | |

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that the applicants claim as priority:


<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NUMBER</u>	<u>MONTH/DAY/YEAR</u>
Japan	2002-218958	July 26, 2002

Certified copies of the corresponding Convention Application(s)

- ☒ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee
- ☐ were filed in prior application Serial No. filed
- ☐ were submitted to the International Bureau in PCT Application Number
Receipt of the certified copies by the International Bureau in a timely manner under PCT Rule 17.1(a) has been acknowledged as evidenced by the attached PCT/IB/304.
- ☐ (A) Application Serial No.(s) were filed in prior application Serial No. filed ; and
- ☐ (B) Application Serial No.(s)
- ☐ are submitted herewith
- ☐ will be submitted prior to payment of the Final Fee

Respectfully Submitted,

OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.
Norman F. Oblon



Vincent K. Shier, Ph.D.
Registration No. 50,552

Customer Number

22850

Tel. (703) 413-3000
Fax. (703) 413-2220
(OSMMN 05/03)

日本国特許庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application: 2002年 7月26日

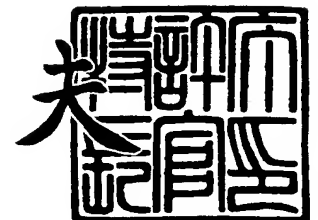
出願番号
Application Number: 特願2002-218958
[ST. 10/C]: [JP2002-218958]

出願人
Applicant(s): 味の素株式会社

2004年 1月22日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今井康夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 PAMA-14175

【提出日】 平成14年 7月26日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 9/00

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
 内

 【氏名】 横関 健三

【発明者】

 【住所又は居所】 神奈川県川崎市川崎区鈴木町 1 番 1 号 味の素株式会社
 内

 【氏名】 鈴木 園子

【特許出願人】

 【識別番号】 0000000066

 【氏名又は名称】 味の素株式会社

【代理人】

 【識別番号】 100089118

 【弁理士】

 【氏名又は名称】 酒井 宏明

【手数料の表示】

 【予納台帳番号】 036711

 【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

 【物件名】 明細書 1

 【物件名】 図面 1

 【物件名】 要約書 1

 【物件名】 原寄託についての受託証 2

 【援用の表示】 手続補足書にて提出の受託証

【包括委任状番号】 0202890

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 トリペプチド以上のペプチドの製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、当該アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する酵素または酵素含有物を用いて、トリペプチド以上のペプチドを生成することを特徴とする、トリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【請求項 2】 前記酵素または酵素含有物が、カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、当該アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、および、該微生物の菌体処理物からなる群より選ばれる 1 種または 2 種以上であることを特徴とする、請求項 1 に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【請求項 3】 前記酵素または酵素含有物が、カルボキシ成分として、アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る、請求項 1 または 2 に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【請求項 4】 前記酵素または酵素含有物が、アミン成分として、ジペプチド以上のペプチド、C 保護されたジペプチド以上のペプチド、C 末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドのいずれをも基質とし得る、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【請求項 5】 前記微生物が、エンペドバクター属に属する微生物であることを特徴とする、請求項 2 に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【請求項 6】 前記微生物が、下記 (a) または (b) の DNA がコードするタンパク質を発現可能なように形質転換された微生物であることを特徴とする、請求項 2 に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

(a) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基番号のうちの塩基番号 61～1908 の塩基配列からなる DNA

(b) 配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1908 の

塩基配列と相補的な塩基配列からなるDNAとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNA

【請求項7】 前記酵素が、下記(A)または(B)のタンパク質である、請求項1に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

(A) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

(B) 配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、カルボキシ成分とジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する活性を有するタンパク質

【請求項8】 前記カルボキシ成分が、L-アラニンエステル、グリシンエステルおよびL-トレオニンエステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価にペプチドを製造できるペプチドの製造方法に関する。より詳細には、カルボキシ成分とアミン成分とからのペプチド生成反応を触媒する酵素を用いてトリペプチド以上のペプチドを製造する方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

ペプチドは、医薬品、食品等のさまざまな分野で利用されている。例えば、L-アラニル-L-グルタミンはL-グルタミンに比べ安定かつ水溶性も高いことから、輸液や無血清培地の成分として広く用いられている。

【0003】

ペプチドの製造法としては従来から化学合成法が知られているが、その製造法は必ずしも簡便なものではなかった。例えば、N-ベンジルオキシカルボニルアラニン（以下Z-アラニンと称する）と保護L-グルタミンを用いる方法（Bull

. Chem. Soc. Jpn., 34, 739(1961)、Bull. Chem. Soc. Jpn., 35, 1966(1962))、Z-アラニンと保護L-グルタミン酸-γ-メチルエステルを用いる方法 (Bull. Chem. Soc. Jpn., 37, 200(1964))、Z-アラニンエステルと無保護グルタミン酸を用いる方法 (特開平 1-9 6 1 9 4 号公報)、2-置換-プロピオニルハロイドを原料として、N-(2-置換)-プロピオニルグルタミン誘導体を中間体として合成する方法 (特開平 6-2 3 4 7 1 5 号公報) 等が知られている。

【0 0 0 4】

しかしながら、いずれの方法においても、保護基の導入脱離、もしくは光学活性中間体の使用が必要であり、工業的に有利で十分に満足できる製造方法ではなかった。

【0 0 0 5】

一方、酵素を用いたペプチドの代表的製造法としては、N保護、C無保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる縮合反応 (反応 1)、および、N保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応 (反応 2) が広く知られている。(反応 1) の例としては、Z-アスパラギン酸とフェニルアラニンメチルエステルからのZ-アスパルチルフェニルアラニンメチルエステルの製造方法 (特開昭 5 3-9 2 7 2 9 号公報)、(反応 2) の例としてはアセチルフェニルアラニンエチルエステルとロイシンアミドからのアセチルフェニルアラニルロイシンアミドの製造方法 (Biochemical J., 163, 531 (1977)) が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分を用いる方法の報告研究例は極めて少なく、N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C保護のアミン成分を用いる置換反応 (反応 3) の例としては特許W0 90/0155 5があり、例えばアルギニンエチルエステルとロイシンアミドからのアルギニルロイシンアミドの製造方法が挙げられる。N無保護、C保護のカルボキシ成分とN無保護、C無保護のアミン成分を用いる置換反応 (反応 4) の例としては、特許EP 278787A1とEP 359399B1があり、例えばチロシンエチルエステルとアラニンからのチロシルアラニンの製造方法が挙げられる。

【0 0 0 6】

【発明が解決しようとする課題】

上記の（反応1）から（反応4）の方法の中で最も安価な製造方法となり得るのは、当然ながら保護基の数が最も少ない（反応4）の範疇に入る反応である。

【0007】

しかしながら、（反応4）の先行例（特許EP 278787A1）には以下の大きな問題点があった。（1）ペプチド生成速度が極めて遅い、（2）ペプチド生成収率が低い、（3）生産できるペプチドが比較的疎水度の高いアミノ酸を含むものに限られる、（4）添加酵素量が極めて大量、（5）カビ、酵母、植物に由来する比較的高価なカルボキシペプチダーゼ標品が必要。（反応4）において、細菌およびサッカロミセス（*Saccharomyces*）属以外の酵母由来の酵素を用いる方法は全く知られておらず、また親水性の高いアラニルグルタミン等のペプチドの製造方法についても全く知られていなかった。このような背景の下、これらペプチドの工業的安価な製造法の開発が望まれていた。

【0008】

また、酵素を用いた上記反応4のペプチドの製造方法は、ジペプチドの生成に限られており、工業的に十分利用可能なように、トリペプチド以上のペプチドを簡便に製造する方法の開発が望まれていた。

【0009】

本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価に、トリペプチド以上のペプチドを製造することができる方法を提供することを課題とする。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記目的に鑑み鋭意研究を重ねた結果、本発明者らは新たに見出したエンペドバクター（*Empedobacter*）属に属する細菌からトリペプチド以上のペプチドを効率良く生成する酵素を見出し、本発明を完成するに至った。

【0011】

即ち、本発明は、以下のとおりである。

〔1〕 カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、当該アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する

酵素または酵素含有物を用いて、トリペプチド以上のペプチドを生成することを特徴とする、トリペプチド以上のペプチドの製造方法。

〔2〕 前記酵素または酵素含有物が、カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、当該アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する微生物の培養物、該培養物より分離した微生物菌体、および、該微生物の菌体処理物からなる群より選ばれる 1 種または 2 種以上であることを特徴とする、上記〔1〕に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

〔3〕 前記酵素または酵素含有物が、カルボキシ成分として、アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る、上記〔1〕または〔2〕に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

〔4〕 前記酵素または酵素含有物が、アミン成分として、ジペプチド以上のペプチド、C 保護されたジペプチド以上のペプチド、C 末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドのいずれをも基質とし得る、上記〔1〕から〔3〕のいずれか一項に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

〔5〕 前記微生物が、エンペドバクター属に属する微生物であることを特徴とする、上記〔2〕に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

〔6〕 下記（a）または（b）の DNA がコードするタンパク質を発現可能なように形質転換された微生物であることを特徴とする、上記〔2〕に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

（a）配列表の配列番号 5 に記載の塩基番号のうちの塩基番号 61～1908 の塩基配列からなる DNA

（b）配列表の配列番号 5 に記載の塩基配列のうちの塩基番号 61～1908 の塩基配列と相補的な塩基配列からなる DNA とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつペプチド生成活性を有するタンパク質をコードする DNA

〔7〕 前記酵素が、下記（A）または（B）のタンパク質である、上記〔1〕請求項 1 に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

（A）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質

（B）配列表の配列番号 6 に記載のアミノ酸配列において、1 若しくは数個のア

ミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、又は逆位を含むアミノ酸配列を有し、かつ、カルボキシ成分とジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する活性を有するタンパク質

〔8〕 前記カルボキシ成分が、L-アラニンエステル、グリシンエステルおよびL-トレオニンエステルからなる群より選ばれる1種または2種以上であることを特徴とする、上記〔1〕から〔7〕のいずれか一項に記載のトリペプチド以上のペプチドの製造方法。

【0012】

【発明の実施の形態】

以下、本発明のトリペプチド以上のペプチドを製造する方法について、

1. トリペプチド以上のペプチドの製造方法、
 2. 本発明で用いられる酵素、
- の順に詳細に説明する。

【0013】

本明細書において、カルボキシ成分とは、ペプチド結合($-CONH-$)におけるカルボニル部位(CO)を供給する成分のことをいい、アミン成分とは、ペプチド結合におけるアミノ部位(NH)を供給する成分のことをいう。また、本明細書において、単に「ペプチド」というときは、特に断らない限り、少なくとも1つ以上のペプチド結合を有するポリマーのことをいう。また、「ジペプチド」とは1つのペプチド結合を有するペプチドのことをいう。また、「トリペプチド以上のペプチド」とはペプチド結合を少なくとも2つ以上有するペプチドのことをいう。

【0014】

1. トリペプチド以上のペプチドの製造方法

本発明のトリペプチド以上のペプチドを製造する方法（以下、「本発明のペプチド製造方法」ともいう）は、カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する酵素または当該酵素の含有物を、カルボキシ成分とアミン成分とに作用させ、トリペプチド以上のペプチドを生成せしめるものである。

【0015】

酵素または酵素含有物を、カルボキシ成分とアミン成分に作用せしめる方法としては、当該酵素または酵素含有物、カルボキシ成分、およびアミン成分を混合すればよい。より具体的には、酵素または酵素含有物をカルボキシ成分およびアミン成分を含む溶液中に添加して反応せしめる方法を用いてもよいし、当該酵素を生産する微生物を用いる場合には、当該酵素を生産する微生物を培養し、微生物中または微生物の培養液中に当該酵素を精製・蓄積せしめ、培養液中にカルボキシ成分とアミン成分を添加する方法などを用いてもよい。生成されたトリペプチド以上のペプチドは、定法により回収し、必要に応じて精製することができる。

【0016】

「酵素含有物」とは、当該酵素を含有するものであればよく、具体的形態としては、当該酵素を生産する微生物の培養物、当該培養物から分離された微生物菌体、菌体処理物などが含まれる。微生物の培養物とは、微生物を培養して得られる物のことであり、より具体的には、微生物菌体、その微生物の培養に用いた培地および培養された微生物により生成された物質の混合物などのことをいう。また、微生物菌体は洗浄し、洗浄菌体として用いてもよい。また、菌体処理物には、菌体を破碎、溶菌、凍結乾燥したものなどが含まれ、さらに菌体などを処理して回収される粗酵素、さらに精製した精製酵素なども含まれる。精製処理された酵素としては、各種精製法によって得られる部分精製酵素等を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化酵素を使用してもよい。また、使用する微生物によっては、培養中に一部、溶菌するものもあるので、この場合には培養液上清も酵素含有物として利用できる。

【0017】

また、当該酵素を含む微生物としては野生株を用いてもよいし、本酵素を発現した遺伝子組換え株を用いてもよい。当該微生物としては、酵素微生物菌体に限らず、アセトン処理菌体、凍結乾燥菌体等の菌体処理物を使用してもよいし、これらを共有結合法、吸着法、包括法等によって固定化した固定化菌体、固定化菌体処理物を使用してもよい。

【0018】

トリペプチド以上のペプチドを生成する活性のあるペプチド生成酵素を生産できる野生株を用いる場合には、遺伝子組み換え株などを作製する手間なしに、より簡便にペプチド生産を行える点などで好適である。他方、トリペプチド以上のペプチドを生成する活性のあるペプチド生成酵素を発現可能なように形質転換した遺伝子組み換え株はペプチド生成酵素をより大量生成するように改変することが可能であるため、トリペプチド以上のペプチドの合成も大量により速く行うことが可能となり得る。野生株または遺伝子組み換え株の微生物を培地中で培養し、培地中および／または微生物中に、当該ペプチド生成酵素を蓄積させて、アミノ酸エステルおよびジペプチド以上のアミン成分に混合して、トリペプチド以上のペプチドを生成することができる。

【0019】

なお、培養物、培養菌体、洗浄菌体、菌体を破碎あるいは溶菌させた菌体処理物を用いる場合には、ペプチドの生成に関与せずに生成ペプチドを分解する酵素が存在することが多く、この場合には、エチレンジアミン四酢酸（EDTA）のような金属プロテアーゼ阻害剤を添加するほうが好ましい場合がある。添加量は、0.1 mMから300 mMの範囲で、好ましくは1 mMから100 mMである。

【0020】

酵素または酵素含有物の使用量は、目的とする効果を発揮する量（有効量）であればよく、この有効量は当業者であれば簡単な予備実験により容易に求められるが、例えば酵素を用いる場合には、0.01から100ユニット（U）程度、洗浄菌体を用いる場合は1～500 g/L程度である。

【0021】

カルボキシ成分としては、もう一つの基質であるアミン成分と縮合してペプチドを生成できるものであれば、いかなるものを使用してよい。カルボキシ成分としては、例えば、L-アミノ酸エステル、D-アミノ酸エステル、L-アミノ酸アミド、D-アミノ酸アミド等が挙げられる。また、アミノ酸エステルあるいはアミノ酸アミドとしては、天然型のアミノ酸に対応するアミノ酸エステルあるい

はアミノ酸アミドだけでなく、非天然型のアミノ酸もしくはその誘導体に対応するアミノ酸エステルあるいはアミノ酸アミドなども例示される。また、アミノ酸エステルあるいはアミノ酸アミドとしては、 α -アミノ酸エステルあるいはアミノ酸アミドの他、アミノ基の結合位置の異なる、 β -、 γ -、 ω -等のアミノ酸エステルあるいはアミノ酸アミドなども例示される。アミノ酸エステルの代表例としては、アミノ酸のメチルエステル、エチルエステル、*n*-プロピルエステル、*iso*-プロピルエステル、*n*-ブチルエステル、*iso*-ブチルエステル、*tert*-ブチルエステル等が例示される。

【0022】

アミン成分としては、もう一つの基質であるカルボキシ成分と縮合してペプチドを生成できるペプチドであれば、いかなるものも使用してよい。アミン成分としての最小単位はジペプチドであり、上限は特に限定されない。また、アミン成分となるペプチドのアミノ酸配列も特に限定されない。また、アミン成分となるペプチドは側鎖が修飾されたものであってもよいし、アミノ酸ではなくアミンが含まれたものでもよい。具体的には、前記アミン成分として、ジペプチド以上のペプチド、C保護されたジペプチド以上のペプチド、C末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチド等が挙げられる。C末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドとは、トリペプチドを例にした場合、N末端アミノ酸-アミノ酸-アミンの構造となるペプチドである。

【0023】

出発原料であるカルボキシ成分およびアミン成分の濃度は各々 1 mM~10 M、好ましくは 0.05 M~2 M であるが、カルボキシ成分に対してアミン成分を等量以上添加したほうが好ましい場合がある。また、基質が高濃度だと反応を阻害するような場合には、反応中にこれらを阻害しない濃度にして逐次添加することができる。

【0024】

反応温度は 0~60℃でペプチド生成可能であり、好ましくは 5~40℃である。また反応 pH は pH 6.5~10.5 でペプチド生成可能であり、好ましくは pH 7.0~10.0 である。

【0025】

所望のアミノ酸配列を有するようにトリペプチド以上のペプチドを生成するには、所望のアミノ酸配列になるように、カルボキシ成分となるアミノ酸エステルを1種ずつ選択して、逐次的にアミノ酸を伸長させていけばよい。例えば、L-Ala-L-His-L-Alaの配列を有するトリペプチドを生成するには、アラニンメチルエステルをカルボキシ成分とし、L-His-L-Alaの配列を有するジペプチドをアミン成分として合成すればよい。トリペプチド生成後、さらに、グリシンメチルエステルをカルボキシ成分として添加し、反応させることにより、Gly-L-Ala-L-His-L-Alaの配列を有するペプチドを得ることができる。

【0026】

2. 本発明で用いられる酵素

上記本発明のペプチド製造方法では、カルボキシ成分と、ジペプチド以上のペプチドであるアミン成分とから、アミン成分よりペプチド結合が一つ多いペプチドを生成する能力を有する酵素が用いられる。本発明のペプチド製造方法では、このような活性を有する酵素であれば、その由来、取得方法などに限定されるものではない。以下に、本発明で用いられる酵素を有する微生物、微生物の培養、酵素の精製、遺伝子工学的な手法の利用などについて説明する。

【0027】

(2-1) 本発明の製法に用いることができる酵素を有する微生物

本発明の酵素を生産する微生物としては、例えばエンペドバクター属またはスフィンゴバクテリウム属に属する細菌などが挙げられ、より具体的にはエンペドバクター ブレビス (*Empedobacter brevis*) ATCC 14234株 (FERM P-18545株、FERM BP-8113株)、スフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) FERM BP-8124 株が挙げられる。エンペドバクター ブレビス ATCC 14234株 (FERM P-18545株、FERM BP-8113株) およびスフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) FERM BP-8124株は、本発明者らが、カルボキシ成分とアミン成分からペプチドを高収率で生産する酵素の生産菌を検索した結果に選出した微生物である。

【0028】

エンペドバクター ブレビス ATCC 14234株 (FERM P-18545株、FERM BP-8113株) は、2001年10月1日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センター (日本国茨城県つくば市東1丁目1番地 中央第6) に寄託され、FERM P-18545の受託番号が付与され、さらに平成14年7月8日に、独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターにおいて、ブダペスト条約に基づく寄託へ移管され、FERM BP-8113が付与された微生物である (微生物の表示: *Empedobacter brevis* AJ 13933株)。

【0029】

スフィンゴバクテリウム エスピー AJ 110003株は、2002年7月22日に独立行政法人産業技術総合研究所特許微生物寄託センターに寄託され、FERM BP-8124の受託番号が付与されている。尚、AJ 110003 (FERM BP-8124) は、以下の分類実験により、上述のスフィンゴバクテリウム エスピーであることが同定された。FERM BP-8124株は、桿菌 ($0.7\sim0.8\times1.5\sim2.0\mu\text{m}$)、グラム陰性、孢子形成なし、運動性なし、コロニー形態は円形、全縁滑らか、低凸状、光沢あり、淡黄色、30℃で生育、カタラーゼ陽性、オキシダーゼ陽性、OFテスト (グルコース) 陰性の性質より、スフィンゴバクテリウムに属する細菌と同定された。更に、硝酸塩還元陰性、インドール産生陰性、グルコースからの産生陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陰性、ウレアーゼ陽性、エスクリン加水分解陽性、ゼラチン加水分解陰性、 β -ガラクトシダーゼ陽性、グルコース資化陽性、L-アラビノース資化陰性、D-マンノース資化陽性、D-マンニトール資化陰性、N-アセチル-D-グルコサミン資化陽性、マルトース資化陽性、グルコン酸カリウム資化陰性、n-カプリン酸陰性、アジピン酸資化陰性、d1-リンゴ酸資化陰性、クエン酸ナトリウム資化陰性、酢酸フェニル資化陰性、チトクロームオキシダーゼ陽性の性質より、スフィンゴバクテリウム マルチボーラムあるいはスフィンゴバクテリウム スピリチボーラムの性状に類似することが判明した。更に16SrRNA遺伝子の塩基配列のホモロジー解析の結果、スフィンゴバクテリウム マルチボーラムと最も高いホモロジー (98.8%) を示したが、完全に一致する株はなかったことより、本菌株をスフィンゴバクテリウム エスピー (*Sphingobacterium* sp.) と同定した。

【0030】**(2-2) 微生物の培養**

本発明で用いられる酵素を有する微生物の培養菌体を得るには、当該微生物を適当な培地で培養増殖せしめるとよい。このための培地はその微生物が増殖し得るものであれば特に制限はなく、通常炭素源、窒素源、リン源、硫黄源、無機イオン、更に必要に応じ有機栄養源を含む通常の培地でよい。

【0031】

例えば、炭素源としては上記微生物が利用可能であればいずれも使用でき、具体的には、グルコース、フラクトース、マルトース、アミロース等の糖類、ソルビトール、エタノール、グリセロール等のアルコール類、フマル酸、クエン酸、酢酸、プロピオン酸などの有機酸類及びこれらの塩類、パラフィンなどの炭水化物類あるいはこれらの混合物などを使用することができる。

【0032】

窒素源としては、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウムなどの無機塩のアンモニウム塩、フマル酸アンモニウム、クエン酸アンモニウムなどの有機酸のアンモニウム塩、硝酸ナトリウム、硝酸カリウムなどの硝酸塩、ペプトン、酵母エキス、肉エキス、コーンステープリカーなどの有機窒素化合物あるいはこれらの混合物を使用することができる。

【0033】

他に無機塩類、微量金属塩、ビタミン類等、通常の培地に用いられる栄養源を適宜混合して用いることができる。

【0034】

培養条件にも格別の制限はなく、例えば、好気的条件下にてpH 5～8、温度15～40℃の範囲でpHおよび温度を適当に制限しつつ12～48時間程度培養を行えばよい。

【0035】**(2-3) 酵素の精製**

上記のように、本発明で用いられるペプチド生成酵素は、例えばエンペドバクター属に属する細菌から精製することができる。当該酵素を精製する例として、

エンペドバクター ブレビスからペプチド生成酵素を単離・精製する方法を説明する。

【0036】

まず、エンペドバクター ブレビス、例えばFERM BP-8113株の菌体から、超音波破碎等の物理的方法、あるいは細胞壁溶解酵素等を用いた酵素法等により菌体を破壊し、遠心分離等により不溶性画分を除いて菌体抽出液を調製する。このようにして得られる菌体抽出液を、通常のタンパク質の精製法、陰イオン交換クロマトグラフィー、陽イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどを組み合わせて分画することによって、ペプチド生成酵素を精製することができる。

【0037】

陰イオン交換クロマトグラフィー用の担体としては、Q-Sepharose HP（アマシヤム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させると当該酵素はpH8.5の条件下で非吸着画分に回収される。

【0038】

陽イオンクロマトグラフィー用担体としては、MonoS HR（アマシヤム社製）が挙げられる。本酵素を含む抽出液をこれらの担体を詰めたカラムに通液させて本酵素をカラムに吸着させ、カラムを洗浄した後に、高塩濃度の緩衝液を用いて酵素を溶出させる。その際、段階的に塩濃度を高めてもよく、濃度勾配をかけてもよい。例えば、MonoS HRを用いた場合には、カラムに吸着した本酵素は、0.2～0.5 M程度のNaClで溶出される。

【0039】

上記のようにして精製された本酵素は、さらにゲル濾過クロマトグラフィー等により均一に精製できる。ゲル濾過クロマトグラフィー用担体としては、Sephadex 200pg（アマシヤム社製）が挙げられる。

【0040】

上記精製操作において、本酵素を含む画分は、後述する実施例に示される方法等により、各画分のペプチド生成活性を測定することにより、確認することができる。上記のようにして精製された本酵素の内部アミノ酸配列を、配列表の配列

番号 1 及び配列番号 2 に示す。

【0041】

また、本発明の酵素として好ましいものの一形態には、カルボキシ成分として、アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る性質を有する酵素が挙げられる。「アミノ酸エステル、アミノ酸アミドのいずれをも基質とし得る」というのは、アミノ酸エステルの少なくとも 1 種以上、アミノ酸アミドの少なくとも 1 種以上を基質とし得ることを意味する。また、本発明の酵素として好ましいものの一形態には、アミン成分として、ジペプチド以上のペプチド、C 保護されたジペプチド以上のペプチド、C 末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドのいずれをも基質とし得る性質を有する酵素が挙げられる。ジペプチド以上のペプチド、C 保護されたジペプチド以上のペプチド、C 末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドのいずれをも基質とし得る」というのは、ジペプチド以上のペプチドの少なくとも 1 種以上、C 保護されたジペプチド以上のペプチドの少なくとも 1 種以上、および、C 末端分子がアミノ酸ではなくアミンであるジペプチド以上のペプチドの少なくとも 1 種以上を基質とし得ることを意味する。カルボキシ成分またはアミノ成分について幅広い基質特異性を有することは、工業生産の場におけるコスト、生産設備などの点で都合のよい原料の選択性が広がるという点で好ましい。

【0042】

(2-4) DNA の単離、形質転換体の作製およびペプチド生成酵素の精製

(2-4-1) DNA の単離

本発明者らは、まずエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株から、本発明のペプチド製造方法で用いることができるペプチド生成酵素の DNA の 1 種を単離することに成功した。本発明の DNA である配列番号 5 に記載の塩基番号 61～1908 の塩基配列からなる DNA は、エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株より単離されたものである。なお、塩基番号 61～1908 の塩基配列からなる DNA は、コードシーケンス (CDS) 部分である。なお、以下に挙げる種々の遺伝子組換え技法については、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989) などの記載に準じ

て行うことができる。

【0043】

本発明で用いることができる酵素をコードするDNAは、エンペドバクターブレビスの染色体DNA、もしくはDNAライブラリーから、PCR (polymerase chain reaction、White, T.J. et al ;Trends Genet., 5, 185(1989)参照) またはハイブリダイゼーションによって取得することができる。PCRに用いるプライマーは、上記(3)の欄で説明したようにして精製されたペプチド生成酵素に基づいて決定された内部アミノ酸配列に基づいて設計することができる。また、本発明によりペプチド生成酵素遺伝子(配列番号5)の塩基配列が明らかになったので、これらの塩基配列に基づいてプライマーまたはハイブリダイゼーション用のプローブを設計することもでき、プローブを使って単離することもできる。PCR用のプライマーとして、5' 非翻訳領域及び3' 非翻訳領域に対応する配列を有するプライマーを用いると、本酵素のコード領域全長を増幅することができる。具体的には、5' 側プライマーとしては配列番号5において塩基番号61よりも上流の領域の塩基配列を有するプライマーが、3' 側プライマーとしては塩基番号1908よりも下流の領域の塩基配列に相補的な配列を有するプライマーが挙げられる。

【0044】

プライマーの合成は、例えば、Applied Biosystems社製DNA合成機 model 380Bを使用し、ホスホアミダイト法を用いて(Tetrahedron Letters(1981), 22, 1859参照) 常法に従って合成できる。PCR反応は、例えばGene Amp PCR System 9600 (PERKIN ELMER社製) 及びTaKaRa LA PCR in vitro Cloning Kit (宝酒造社製) を用い、各メーカーなど供給者により指定された方法に従って行うことができる。

【0045】

本発明のペプチド製造方法で用いることができる酵素をコードするDNAとしては、配列表の配列番号5に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号5に記載のCDSと相補的な塩基配列

からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0046】

本発明のDNAには、配列表の配列番号11に記載のCDSからなるDNAと実質的に同一のDNAも含まれる。すなわち、変異を有する本酵素をコードするDNAまたはこれを保持する細胞などから、配列表の配列番号11に記載のCDSと相補的な塩基配列からなるDNAもしくは同塩基配列から調製されるプローブとストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、ペプチド生成活性を有するタンパク質をコードするDNAを単離することによっても、本発明のDNAと実質的に同一のDNAが得られる。

【0047】

プローブは、例えば配列番号5に記載の塩基配列に基づいて定法により作製することができる。また、プローブを用いてこれとハイブリダイズするDNAをつくり上げ、目的とするDNAを単離する方法も、定法に従って行えばよい。例えば、DNAプローブはプラスミドやファージベクターにクローニングされた塩基配列を増幅し、プローブとして用いたい塩基配列を制限酵素により切り出し、抽出して調製することができる。切り出す箇所は、目的とするDNAに応じて調節することができる。

【0048】

ここでいう「ストリンジェントな条件」とは、いわゆる特異的なハイブリッドが形成され、非特異的なハイブリッドが形成されない条件をいう。この条件を明確に数値化することは困難であるが、一例を示せば、相同性が高いDNA同士、例えば50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上の相同性を有するDNA同士がハイブリダイズし、それより相同性が低いDNA同士がハイブリダイズしない条件、あるいは通常のサザンハイブリダイゼーションの洗いの条件である60℃、1×SSC、0.1%SDS、好ましくは、0.1×SSC、0.1%SDSに相当する塩濃度でハイブリダイズする条件が挙げら

れる。このような条件でハイブリダイズする遺伝子の中には途中にストップコードが発生したものや、活性中心の変異により活性を失ったものも含まれるが、それらについては、市販の発現ベクターにつなぎ、適当な宿主で発現させて、発現産物の酵素活性を後述の方法で測定することによって容易に取り除くことができる。

【0049】

配列表の配列番号5に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号6に示される。また、配列表の配列番号11に記載のCDSによりコードされるアミノ酸配列は、配列表の配列番号12に示される。本発明のDNAによりコードされるタンパク質は、ペプチド生成活性を有するタンパク質であり、このような活性が損なわれない限り、配列表の配列番号6もしくは配列番号12のアミノ酸配列を有するタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAも、本発明のDNAに含まれる。

【0050】

すなわち、本発明で用いることができる酵素をコードするDNAとしては、(A) または (B) に示すタンパク質をコードするDNAも挙げられる。

(A) 配列表の配列番号6または配列番号12に記載のアミノ酸配列を有するタンパク質。

(B) 配列表の配列番号6または配列番号12に記載のアミノ酸配列において、1若しくは数個のアミノ酸の置換、欠失、挿入、付加、または逆位を含むアミノ酸配列からなり、かつペプチド生成活性を有するタンパク質。ユニバーサルコードンのコードに従ってアミノ酸配列から塩基配列は特定される。

【0051】

ここで、「数個」とは、アミノ酸残基のタンパク質の立体構造における位置や種類によっても異なるが、2～100個、より好ましくは、2～50個、さらに好ましくは2～10個である。

【0052】

上記(B)に示されるような変異は、例えば部位特異的変異法によって、本酵素遺伝子の特定の部位のアミノ酸が置換、欠失、挿入、付加されるように塩基配

列を改変することによって得られる。また、上記のような改変されたDNAは、従来知られている突然変異処理によっても取得され得る。突然変異処理としては、本酵素をコードするDNAをヒドロキシルアミン等でインビトロ処理する方法、及び本酵素をコードするDNAを保持するエシェリヒア属細菌を、紫外線照射またはN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン (NTG) もしくは亜硝酸等の通常人工突然変異に用いられている変異剤によって処理する方法が挙げられる。

【0053】

また、上記のような塩基の置換、欠失、挿入、付加、または逆位等には、微生物の種あるいは菌株による差等、天然に生じる変異も含まれる。上記のような変異を有するDNAを適当な細胞で発現させ、発現産物の本酵素活性を調べることにより、配列表の配列番号6に記載のタンパク質と実質的に同一のタンパク質をコードするDNAが得られる。

【0054】

(2-4-2) 形質転換体の作製およびペプチド生成酵素の生成

上記(2-4-1)で説明したDNAを適当な宿主に導入し、発現させることによって、本発明のペプチド製造方法で用いることができるペプチド生成酵素を生成することができる。

【0055】

DNAにより特定されるタンパク質を発現させるための宿主としては、宿主としては、エシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) 等のエシェリヒア属細菌、エンペドバクター属細菌、スフィンゴバクテリウム属細菌、フラボバクテリウム細菌及びバチルス ズブチリス (*Bacillus subtilis*) をはじめとする種々の原核細胞、サッカロマイセス セレビシエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピヒア スティピティス (*Pichia stipitis*)、アスペルギルス・オリゼ (*Aspergillus oryzae*) をはじめとする種々の真核細胞を用いることができる。

【0056】

DNAを宿主に導入するのに用いる組換えDNAは、発現させようとする宿主の種類に応じたベクターに、導入しようとするDNAを、該DNAがコードする

タンパク質が発現可能な形態で挿入することで調製可能である。本発明のDNAを発現させるためのプロモータとしては、エンペドバクター ブレビスなどのペプチド生成酵素遺伝子固有のプロモータが宿主細胞で機能する場合には該プロモータを使用することができる。また、必要に応じて宿主細胞で働く他のプロモータを本発明のDNAに連結し、該プロモータ制御下で発現させるようにしてもよい。

【0057】

組換えDNAを宿主細胞に導入するための形質転換法としては、D.M.Morrisonの方法 (Methods in Enzymology 68, 326 (1979)) あるいは受容菌細胞を塩化カルシウムで処理してDNAの透過性を増す方法 (Mandel, M. and Higa, A., J.Mol. Biol., 53, 159 (1970)) 等が挙げられる。

【0058】

タンパク質を組換えDNA技術を用いて大量生産する場合、該タンパク質を生産する形質転換体内で該タンパク質が会合し、タンパク質の封入体 (inclusion body) を形成させる形態も好ましい一実施形態として挙げられる。この発現生産方法の利点は、目的のタンパク質を菌体内に存在するプロテアーゼによる消化から保護する点および目的のタンパク質を菌体破碎に続く遠心分離操作によって簡単に精製できる点等である。

【0059】

このようにして得られるタンパク質封入体は、タンパク質変性剤により可溶化され、主にその変性剤を除去することによる活性再生操作を経た後、正しく折り畳まれた生理的に活性なタンパク質に変換される。例えば、ヒトインターロイキン-2の活性再生 (特開昭61-257931号公報) 等多くの例がある。

【0060】

タンパク質封入体から活性型タンパク質を得るためには、可溶化・活性再生等の一連の操作が必要であり、直接活性型タンパク質を生産する場合よりも操作が複雑になる。しかし、菌体の生育に影響を及ぼすようなタンパク質を菌体内で大量に生産させる場合は、不活性なタンパク質封入体として菌体内に蓄積させることにより、その影響を抑えることができる。

【0061】

目的タンパク質を封入体として大量生産させる方法として、強力なプロモータの制御下、目的のタンパク質を単独で発現させる方法の他、大量発現することが知られているタンパク質との融合タンパク質として発現させる方法がある。

【0062】

以下、形質転換された大腸菌を作製し、これを用いてペプチド生成酵素を製造する方法の一例を説明する。ペプチド生成酵素をコードするDNAを発現させるプロモータとしては、通常大腸菌における異種タンパク質生産に用いられるプロモータを使用することができ、例えば、T7プロモータ、lacプロモータ、trpプロモータ、trcプロモータ、tacプロモータ、ラムダファージのPRプロモータ、PLプロモータ等の強力なプロモータが挙げられる。また、ベクターとしては、pUC19、pUC18、pBR322、pHSG299、pHSG298、pHSG399、pHSG398、RSF1010、pMW119、pMW118、pMW219、pMW218等を用いることができる。他にもファージDNAのベクターも利用できる。さらに、プロモータを含み、挿入DNA配列を発現させることができる発現ベクターを使用することもできる。

【0063】

ペプチド生成酵素を融合タンパク質封入体として生産させるためには、ペプチド生成酵素遺伝子上流あるいは下流に、他のタンパク質、好ましくは親水性であるペプチドをコードする遺伝子を連結して、融合タンパク質遺伝子とする。このような他のタンパク質をコードする遺伝子としては、融合タンパク質の蓄積量を増加させ、変性・再生工程後に融合タンパク質の溶解性を高めるものであればよく、例えば、T7 gene 10、 β -ガラクトシダーゼ遺伝子、デヒドロ葉酸還元酵素遺伝子、 γ インターフェロン遺伝子、インターロイキン-2遺伝子、プロキモシン遺伝子等が候補として挙げられる。

【0064】

これらの遺伝子とペプチド生成酵素をコードする遺伝子とを連結する際には、コドンの読み取りフレームが一致するようにする。適当な制限酵素部位で連結するか、あるいは適当な配列の合成DNAを利用すればよい。

【0065】

また、生産量を増大させるためには、融合タンパク質遺伝子の下流に転写終結配列であるターミネータを連結することが好ましい場合がある。このターミネータとしては、T7ターミネータ、fdファージターミネータ、T4ターミネータ、テトラサイクリン耐性遺伝子のターミネータ、大腸菌 *trpA* 遺伝子のターミネータ等が挙げられる。

【0066】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子を大腸菌に導入するためのベクターとしては、いわゆるマルチコピー型のものが好ましく、ColE1由来の複製開始点を有するプラスミド、例えばpUC系のプラスミドやpBR322系のプラスミドあるいはその誘導体が挙げられる。ここで、「誘導体」とは、塩基の置換、欠失、挿入、付加または逆位などによってプラスミドに改変を施したものを意味する。なお、ここでいう改変とは、変異剤やUV照射などによる変異処理、あるいは自然変異などによる改変をも含む。

【0067】

また、形質転換体を選別するために、該ベクターがアンピシリン耐性遺伝子等のマーカーを有することが好ましい。このようなプラスミドとして、強力なプロモータを持つ発現ベクターが市販されている（pUC系（宝酒造（株）製）、pPROK系（クローンテック製）、pKK233-2（クローンテック製）ほか）。

【0068】

プロモータ、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質をコードする遺伝子、場合によってはターミネータの順に連結したDNA断片と、ベクターDNAとを連結して組換えDNAを得る。

【0069】

該組換えDNAを用いて大腸菌を形質転換し、この大腸菌を培養すると、ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質が発現生産される。形質転換される宿主は、異種遺伝子の発現に通常用いられる株を使用することができるが、*Escherichia coli* JM109株が好ましい。形質

転換を行う方法、および形質転換体を選別する方法はMolecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press (1989)等に記載されている。

【0070】

融合タンパク質として発現させた場合、血液凝固因子Xa、カリクレインなどの、ペプチド生成酵素内に存在しない配列を認識配列とする制限プロテアーゼを用いてペプチド生成酵素を切り出せるようにしてもよい。

【0071】

生産培地としては、M9ーカザミノ酸培地、LB培地など、大腸菌を培養するために通常用いる培地を用いてもよい。また、培養条件、生産誘導条件は、用いたベクターのマーカ、プロモータ、宿主菌等の種類に応じて適宜選択する。

【0072】

ペプチド生成酵素またはペプチド生成酵素と他のタンパク質との融合タンパク質を回収するには、以下の方法などがある。ペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質が菌体内に可溶化されていれば、菌体を回収した後、菌体を破碎あるいは溶菌させ、粗酵素液として使用できる。さらに、必要に応じて、通常の沈澱、濾過、カラムクロマトグラフィー等の手法によりペプチド生成酵素あるいはその融合タンパク質を精製して用いることも可能である。この場合、ペプチド生成酵素あるいは融合タンパク質の抗体を利用した精製法も利用できる。

【0073】

タンパク質封入体が形成される場合には、変性剤でこれを可溶化する。菌体タンパク質とともに可溶化してもよいが、以降の精製操作を考慮すると、封入体を取り出して、これを可溶化するのが好ましい。封入体を菌体から回収するには、従来公知の方法で行えばよい。例えば、菌体を破壊し、遠心分離操作等によって封入体を回収する。タンパク質封入体を可溶化させる変性剤としては、グアニジン塩酸（例えば、6 M、pH 5～8）や尿素（例えば8 M）などが挙げられる。

【0074】

これらの変性剤を透析等により除くと、活性を有するタンパク質として再生される。透析に用いる透析溶液としては、トリス塩酸緩衝液やリン酸緩衝液などを用いればよく、濃度としては20 mM～0.5 M、pHとしては5～8が挙げら

れる。

【0075】

再生工程時のタンパク質濃度は、 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 程度以下に抑えるのが好ましい。再生したペプチド生成酵素が自己架橋を行うのを抑えるために、透析温度は 5°C 以下であることが好ましい。また、変性剤除去の方法として、この透析法のほか、希釈法、限外濾過法などがあり、いずれを用いても活性の再生が期待できる。

【0076】

【実施例】

以下、実施例をあげて、さらに詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。生成物の測定には、薄層クロマトグラムのニンヒドリン発色での確認（定性）に加え、定量的には以下に示す高速液体クロマトグラフィーにて定量した。カラム：Inertsil ODS-2（GLサイエンス社製）、溶離液： 5.0mM 1-オクタンスルホン酸ナトリウムを含むリン酸水溶液（ $\text{pH}2.1$ ）：メタノール＝ $100:15\sim50$ 、流量： $1.0\text{mL}/\text{min}$ 、検出 210nm 。

【0077】

（実施例1）微生物の培養

1L中にグルコース 5g、硫酸アンモニウム 5g、リン酸一カリウム 1g、リン酸二カリウム 3g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10gを含む培地（ $\text{pH}6.2$ ） 50mL を 500mL 坂口フラスコに分注し、 115°C で15分殺菌した。これに同培地で 30°C 、16時間培養したエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株を1白金耳接種し、 30°C 、 120 往復/分で16時間振盪培養を行った。

【0078】

（実施例2）微生物菌体を用いるペプチドの生産

実施例1で得られた培養液を遠心分離（ $10,000\text{rpm}$ 、15分）し菌体を集め、 10mM EDTAを含む 100mM ホウ酸緩衝液（ $\text{pH}9.0$ ）に $100\text{g}/\text{L}$ になるように懸濁した。懸濁液 1mL を、EDTA 10mM と下記のカルボキシ成

分 200 mMと、下記のアミノ酸 400 mMを含む 100 mMホウ酸緩衝液 (pH 9.0) 1 mLにそれぞれ添加し、全量を 2 mLとした後、18℃にて2時間反応をおこなった。この結果、生成したペプチドを表1に示した。

【0079】

【表1】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	L-Leu	L-Ala-L-Leu	38.2	Gly-OMe	L-His	L-Gly-L-His	22.1
	L-Met	L-Ala-L-Met	68.3	L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	29.0
	L-Phe	L-Ala-L-Phe	62.4	L-Val-OMe	L-Met	L-Val-L-Met	10.5
	L-Ser	L-Ala-L-Ser	51.3	L-Met-OMe	L-Phe	L-Met-L-Phe	28.5
	L-His	L-Ala-L-His	52.1	L-Thr-OMe	L-Leu	L-Thr-L-Leu	23.0
	L-Arg	L-Ala-L-Arg	72.1	L-Ile-OMe	L-Met	L-Ile-L-Met	8.3
	L-Gln	L-Ala-L-Gln	68.0				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0080】

(実施例3) 酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例1と同様に、*Empedobacter brevis* FERM BP-8113を培養し、遠心分離 (10,000rpm, 15分) によって菌体を集めた。菌体 16 gを 50 mMトリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて洗浄後、同緩衝液 40 mLに懸濁し、195 Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離 (10,000rpm, 30分) し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を 50 mMトリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) に対して一夜透析し、超遠心分離 (50,000 rpm, 30分) にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリスー塩酸緩衝液 (pH 8.0) にて予め平衡化したQ-Sepharose HPカラム (アマシャム社製) に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を 50 mM酢酸緩衝液 (pH 4.5) に対して一夜透析し、遠心分離 (10,000rpm, 30分) にて不溶性画分を除去することにより、上

清液として透析画分を得た。この透析画分を 5 0 mM 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) で予め平衡化した Mono S カラム (アマシャム社製) に供し、0 ~ 1 M NaCl を含む同緩衝液の直線的な濃度勾配で酵素を溶出させた。活性画分の内、夾雑タンパクの最も少ない一画分を 1 M NaCl を含む 5 0 mM 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) で予め平衡化した Superdex 200pg カラム (アマシャム社製) に供し、1 M NaCl を含む同緩衝液 (p H 4 . 5) を流すことによりゲル濾過を行い、活性画分溶液を得た。これらの操作により、本発明に使用されるペプチド生成酵素は電気泳動の実験結果より均一に精製されたことが確認された。上記の精製工程における活性の回収率は 1 2 . 2 %、精製度は 7 0 7 倍であった。

【 0 0 8 1 】

(実施例 4) 酵素の分子量測定

(S D S - ゲル電気泳動)

実施例 3 の方法により得られた精製酵素画分 0 . 3 μ g 相当をポリアクリルアミド電気泳動に供した。電気泳動緩衝液には 0 . 3 % (w / v) トリス、1 . 4 4 % (w / v) グリシン、0 . 1 % (w / v) ラウリル硫酸ナトリウムを、ポリアクリルアミドゲルはゲル濃度 1 0 ~ 2 0 % の濃度勾配ゲル (マルチゲル 1 0 - 2 0、第一化学薬品製)、分子量マーカーはファルマシア製分子量マーカーを用いた。電気泳動終了後、クーマシーブリリアントブルー R - 2 5 0 によってゲルを染色し、分子量約 7 5 k D a 位置に均一なバンドが検出された。

【 0 0 8 2 】

(ゲル濾過)

実施例 3 の方法により得られた精製酵素画分を 1 M NaCl を含む 5 0 mM 酢酸緩衝液 (p H 4 . 5) で予め平衡化した Superdex 200pg カラム (アマシャム社製) に供し、1 M NaCl を含む同緩衝液 (p H 4 . 5) を流すことによりゲル濾過を行い、分子量を測定した。検量線を作成するための分子量既知の標準タンパクとしてはファルマシア製分子量マーカーを用いた。この結果、得られた酵素の分子量は約 1 5 0 k D a であった。

【 0 0 8 3 】

S D S - ゲル電気泳動とゲル濾過の結果より、本酵素は分子量約 7 5 k D a の

ホモダイマーであることが示唆された。

【0084】

(実施例5) 酵素の至適 pH

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンからL-アラニル-L-グルタミンを生成する反応におけるpHの影響を検討した。緩衝液としては、酢酸緩衝液(pH 3.9~5.4) MES緩衝液(pH 5.4~6.4)、リン酸緩衝液(pH 6.0~7.9) ホウ酸緩衝液(pH 7.8~9.3)、CAPS緩衝液(pH 9.3~10.7)、および K_2HPO_4 -NaOH緩衝液(pH 10.8~11.6)を用いた。100mM L-アラニンメチルエステル、200mM L-グルタミン、10mMのEDTAを含む100mMのそれぞれの緩衝液100 μ lに実施例3で得られたMono S画分酵素(約180U/ml)を1 μ l加え、18℃、5分間反応させ、反応に対するpHの影響を測定した。ホウ酸緩衝液(pH 9.3)を用いた場合の活性を100%とした結果を図1に示した。この結果、本酵素の至適pHは8~9.5であった。

【0085】

(実施例6) 酵素の至適温度

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンからL-アラニル-L-グルタミンを生成する反応における温度の影響を検討した。100mM L-アラニンメチルエステル、200mM L-グルタミン、10mM EDTAを含む100mMのホウ酸緩衝液(pH 9.0) 100 μ lに実施例5で用いたものと同じ酵素画分を1 μ l加え、各温度にて5分間反応させ、反応に対する温度の影響を測定した。34℃での活性を100%とした結果を図2に示した。この結果、本酵素の至適温度は30~40℃であった。

【0086】

(実施例7) 酵素の阻害剤

L-アラニンメチルエステル塩酸塩とL-グルタミンを基質に用い、L-アラニル-L-グルタミン生成に与える阻害剤の影響を検討した。表2に示す10mMの各種酵素阻害剤を含む100mMのホウ酸緩衝液(pH 9.0) 50 μ lに実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを加え、25℃にて5分間反応させ

た。尚、*o*-フェナンスロリン、フェニルメチルスルフォニルフルオリド、*p*-ニトロフェニル-*p'*-グアニジノベンゾエートについては50 mMになるようにメタノールに溶解したものを使用した。各条件での酵素活性は酵素阻害剤を加えない条件でのL-アラニル-L-グルタミン生成を100とした場合の相対活性で示した。結果を表2に示す。この結果、本酵素は、セリン酵素阻害剤の内、フェニルメチルスルフォニルフルオリドでは阻害されないが、*p*-ニトロフェニル-*p'*-グアニジノベンゾエートで阻害される性質を示した。

【0087】

【表2】

酵素阻害剤		L-Ala-L-Gln生成相対活性 (%)
なし		100
金属酵素阻害剤	EDTA	96
	<i>o</i> -フェナンスロリン	96
SH酵素阻害剤	N-エチルマレイミド	110
	モノヨード酢酸	101
セリン酵素阻害剤	フェニルメチルスルフォニルフルオリド	115
	4-(2-アミノエチル)ベンゼンスルフォニルフルオリド	75
	<i>p</i> -ニトロフェニル <i>p'</i> -グアニジノベンゾエート	0.1

【0088】

(実施例8) L-アラニンメチルエステルとL-グルタミンからのL-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例5で用いたものと同じ酵素画分3 μ lを、100 mMのL-アラニンメチルエステル塩酸塩、200 mMのL-グルタミン、10 mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液(pH 9.0)に加え、18℃にて反応した。この結果、図3に示すように、酵素添加区では、反応60分で83 mMのL-アラニル

ーL-グルタミン (L-Ala-L-Gln) が生成し、副成するL-Ala-L-Ala-L-Glnは1.3 mMであった。一方、酵素無添加区でのL-Ala-L-Gln生成はほとんど認められず、反応120分で0.07 mM程度であった。

【0089】

(実施例9) L-アラニル-L-グルタミンの生産に与えるL-グルタミン濃度の影響

実施例5で用いたものと同じ酵素画分1 μ lを、100 mMのL-アラニンメチルエステル塩酸塩、表3に示す濃度のL-グルタミン、10 mMのEDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、18℃にて2時間反応した。この結果を表3に示した。

【表3】

L-アラニンメチルエステル塩酸塩 (mM)	L-グルタミン (mM)	L-Ala-L-Gln (mM)
100	100	68.2
	110	72.1
	120	73.3
	130	75.1
	150	75.5
	200	82.0

【0090】

(実施例10) 酵素の基質特異性 (1)

カルボキシ成分としてL-アミノ酸エステルを用いた場合のエステル特異性を検討した。実施例5で用いたものと同じ酵素画分2 μ lを、表4に示す100 mMのカルボキシ成分、200 mM L-グルタミン、10 mM EDTAを含む100 μ lのホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて2時間反応した。この反応で生成したL-Ala-L-Gln量を表4に示した (表4中、HClは塩酸塩を示す)。

【表 4】

カルボキシ成分	生成 L-Ala-L-Gln (mM)
L-アラニンメチルエステル・HCl	84.3
L-アラニンエチルエステル・HCl	91.5
L-アラニン- <i>t</i> -ブチルエステル・HCl	7.5

【0091】

(実施例 11) 酵素の基質特異性 (2)

カルボキシ成分に L-アラニンメチルエステル、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、100 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、150 mM の表 5 に示す L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 5 に示した (+印は、ペプチドの生成は確認されているが、標準品がなく定量できなかったもの、tr は微量を示す)。

【表 5】

アミン成分	生成ペプチド (mM)		アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly	L-Ala-Gly	13.7	L-Asn	L-Ala-L-Asn	65.5
L-Ala	L-Ala-L-Ala	25.4	L-Gln	L-Ala-L-Gln	79.3
L-Val	L-Ala-L-Val	20.8	L-Tyr	L-Ala-L-Tyr	17.6
L-Leu	L-Ala-L-Leu	45.3	L-CySH	L-Ala-L-CySH	+
L-Ile	L-Ala-L-Ile	33.9	L-Lys	L-Ala-L-Lys	71.8
L-Met	L-Ala-L-Met	83.3	L-Arg	L-Ala-L-Arg	88.0
L-Phe	L-Ala-L-Phe	74.4	L-His	L-Ala-L-His	66.9
L-Trp	L-Ala-L-Trp	53.9	L-Asp	L-Ala-L-Asp	2.1
L-Ser	L-Ala-L-Ser	62.5	L-Glu	L-Ala-L-Glu	42.9
L-Thr	L-Ala-L-Thr	53.9	L-Pro	L-Ala-L-Pro	tr

【0092】

(実施例 1 2) 酵素の基質特異性 (3)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に L-グルタミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 6 に示す 1 0 0 mM の L-アミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe \cdot HCl)、1 5 0 mM の L-グルタミン、1 0 mM の EDTA を含む 1 0 0 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9. 0) に加え、2 5 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 6 に示した (+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成は確認されているもの、tr は微量を示す)。尚、L-Trp-OMe、L-Tyr-OMe を用いた場合には、反応系に Tween-80 を終末 0. 1 % になるように添加した。

【表 6】

カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	Gly-L-Gln	54.7	L-Tyr-OMe	L-Tyr-L-Gln	3.4
L-Ala-OMe	L-Ala-L-Gln	74.6	CySH-OMe	L-CySH-L-Gln	+
L-Val-OMe	L-Val-L-Gln	15.4	L-Lys-OMe	L-Lys-L-Gln	+
L-Leu-OMe	L-Leu-L-Gln	+	L-Arg-OMe	L-Arg-L-Gln	7.1
L-Ile-OMe	L-Ile-L-Gln	8.4	L-His-OMe	L-His-L-Gln	+
L-Met-OMe	L-Met-L-Gln	12.0	L-Asp- α -OMe	α -L-Asp-L-Gln	tr
L-Phe-OMe	L-Phe-L-Gln	0.9	L-Asp- β -OMe	β -L-Asp-L-Gln	tr
L-Trp-OMe	L-Trp-L-Gln	+	L-Asp-(OMe) ₂	L-Asp(OMe)-L-Gln	13.5
L-Ser-OMe	L-Ser-L-Gln	24.0	L-Glu- α -OMe	α -L-Glu-L-Gln	+
L-Thr-OMe	L-Thr-L-Gln	81.9	L-Glu- γ -OMe	γ -L-Glu-L-Gln	+
L-Asn-OMe	L-Asn-L-Gln	+	L-Pro-OMe	L-Pro-L-Gln	2.2
L-Gln-OMe	L-Gln-L-Gln	0.3			

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0 0 9 3】

(実施例 1 3) 酵素の基質特異性 (4)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 7 に示す 1 0 0 mM の L-アミノ酸メチルエステル塩酸

塩 (AA-OMe · HCl)、表 7 に示す 150 mM の各種 L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃ にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 6 に示した (tr は微量を示す)。尚、L-Asp- α , β -ジメチルエステル (Asp-(OMe)₂) を基質に用いた場合の生成物は、 α -ペプチド (α -Asp(β -OMe)-L-Phe) と、 β -ペプチド (β -Asp(α -OMe)-L-Phe) の双方であり、トータル 10.1 mM 中、 α -ペプチドが 4.5 mM、 β -ペプチド (β -Asp(α -OMe)-L-Phe) が 5.6 mM であった。尚、L-Trp-OMe を用いた場合には、反応系に Tween-80 を終末 0.1% になるように添加した (+印は、標準品がなく定量できなかったものの、生成が確認されているものを示す)。

【0094】

【表 7】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)		カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	L-CySH	Gly-L-CySH	45.6	L-Met-OMe	L-Ser	L-Met-L-Ser	12.8
	L-Arg	Gly-L-Arg	25.5		L-Met	L-Met-L-Met	25.0
	L-Phe	Gly-L-Phe	44.0		L-Phe	L-Met-L-Phe	34.0
	L-His	Gly-L-His	31.6	L-Ile-OMe	L-Ser	L-Ile-L-Ser	17.2
	L-Lys	Gly-L-Lys	9.8		L-Met	L-Ile-L-Met	10.0
	L-Ser	Gly-L-Ser	44.2		L-Phe	L-Ile-L-Phe	5.2
L-Thr-OMe	Gly	L-Thr-Gly	9.4	L-Arg-OMe	L-Ser	L-Arg-L-Ser	3.6
	L-Ala	L-Thr-L-Ala	9.4		L-Met	L-Arg-L-Met	0.7
	L-Val	L-Thr-L-Val	0.7		L-Phe	L-Arg-L-Phe	1.9
	L-Leu	L-Thr-L-Leu	28.4	L-Leu-OMe	L-Met	L-Leu-L-Met	12.2
	L-Met	L-Thr-L-Met	38.6	L-Trp-OMe	L-Met	L-Trp-L-Met	4.1
	L-Ser	L-Thr-L-Ser	58.2	L-Lys-OMe	L-Met	L-Lys-L-Met	6.8
L-Ser-OMe	L-Ser	L-Ser-L-Ser	38.0	L-His-OMe	L-Met	L-His-L-Met	6.5
	L-Met	L-Ser-L-Met	12.5	L-Asn-OMe	L-Glu	L-Asn-L-Glu	10.2
	L-Phe	L-Ser-L-Phe	20.3	L-Asp(OMe) ₂	L-Phe	L-Asp(OMe)-L-Phe	10.1
L-Val-OMe	L-Ser	L-Val-L-Ser	30.8				
	L-Met	L-Val-L-Met	10.3				
	L-Phe	L-Val-L-Phe	6.1				

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0095】

(実施例 14) 酵素の基質特異性 (5)

カルボキシ成分に各種の L-または D-体のアミノ酸メチルエステル、アミン成分に各種の L-または D-体のアミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 8 に示す 100 mM のアミノ酸メチルエステル塩酸塩 (AA-OMe \cdot HCl)、表 8 に示す 150 mM の各種アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 8 に示した (tr は微量を示す)。

【0096】

【表 8】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
D-Ala-OMe	L-Gln	D-Ala-L-Gln	69.3
D-Ala-OMe	L-Ser	D-Ala-L-Ser	20.3
D-Thr-OMe		D-Thr-L-Ser	1.0
D-Ser-OMe		D-Ser-L-Ser	3.3
D-Val-OMe		D-Val-L-Ser	0.6
D-Met-OMe		D-Met-L-Ser	5.1
L-Ala-OMe	D-Gln	L-Ala-D-Gln	0.3
L-Ala-OMe	D-Ser	L-Ala-D-Ser	5.4
L-Thr-OMe		L-Thr-D-Ser	6.9
L-Ser-OMe		L-Ser-D-Ser	16.2
L-Val-OMe		L-Val-D-Ser	1.4
L-Met-OMe		L-Met-D-Ser	1.9
D-Ala-OMe	D-Gln	D-Ala-D-Gln	tr
D-Ala-OMe	D-Ser	D-Ala-D-Ser	0.2
D-Thr-OMe		D-Thr-D-Ser	1.1
D-Ser-OMe		D-Ser-D-Ser	2.5
D-Val-OMe		D-Val-D-Ser	0.5
D-Met-OMe		D-Met-D-Ser	2.7

(カルボキシ成分はいずれも塩酸塩を使用)

【0097】

(実施例 15) 酵素の基質特異性 (6)

カルボキシ成分に各種の L-アミノ酸アミド、アミン成分に各種の L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 9 に示す 100 mM の L-アミノ酸アミド (AA-NH₂·HCl)、表 9 に示す 150 mM の L-アミノ酸、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 9 に示した。

【0098】

【表 9】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Phe-NH ₂	L-Gln	L-Phe-L-Gln	0.2
L-Phe-NH ₂	L-Ser	L-Phe-L-Ser	0.6
L-Ala-NH ₂	L-Gln	L-Ala-L-Gln	7.6
L-Ala-NH ₂	L-Met	L-Ala-L-Met	3.4
L-Ala-NH ₂	L-His	L-Ala-L-His	3.9
L-Thr-NH ₂	L-Gln	L-Thr-L-Gln	0.3

【0099】

(実施例 16) 酵素の基質特異性 (7)

カルボキシ成分に各種の L-アラニンメチルエステル、アミン成分に C 保護 L-アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 10 に示す 100 mM の L-アミノ酸メチルエステル (AA-OMe \cdot HCl)、表 10 に示す 150 mM の L-アミノ酸アミド、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25 $^{\circ}$ C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 10 に示した。

【0100】

【表 10】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	Gly-NH ₂	L-Ala-Gly-NH ₂	7.4
	L-Ala-NH ₂	L-Ala-L-Ala-NH ₂	8.3
	L-Phe-NH ₂	L-Ala-L-Phe-NH ₂	12.2

【0101】

(実施例 17) 酵素の基質特異性 (8)

カルボキシ成分に各種のアミノ酸メチルエステル、アミン成分にメチルアミンを用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 11 に示す 100 mM のアミノ酸メチルエステル (AA-OMe \cdot HCl)

、表 11 に示す 150 mM のメチルアミン、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 11 に示した。

【0102】

【表 11】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	メチルアミン	Gly-メチルアミン	1.1
L-Thr-OMe		L-Thr-メチルアミン	0.2
L-Ala-OMe		L-Ala-メチルアミン	0.3

【0103】

(実施例 18) 酵素の基質特異性 (9)

カルボキシ成分として β -アミノ酸エステル、あるいはアミン成分として β -アミノ酸を用いた場合のペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 2 μ l を、表 12 に示す 100 mM のカルボキシ成分、表 12 に示す 150 mM のアミン成分、10 mM の EDTA を含む 100 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 12 に示した (tr は微量を示す)。

【0104】

【表 12】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
Gly-OMe	β -Ala	Gly- β -Ala	2.2
Gly-OMe	β -Phe	Gly- β -Phe	0.4
L-Ala-OMe	β -Ala	Ala- β -Ala	7.7
L-Ala-OMe	β -Phe	Ala- β -Phe	1.4
L-Thr-OMe	β -Ala	Thr- β -Ala	3.2
L-Thr-OMe	β -Phe	Thr- β -Phe	1.4
β -Ala-OMe	L- α -Ala	β -Ala-L- α -Ala	tr
β -Ala-OMe	β -Ala	β -Ala- β -Ala	0.2
β -Ala-OMe	L-Gln	β -Ala-L-Gln	0.6
β -Ala-OMe	L-Ser	β -Ala-L-Ser	3.2

【0105】

(実施例 19) 酵素の基質特異性 (10)

カルボキシ成分として L-アミノ酸エステル、アミン成分としてペプチドを用いた場合のオリゴペプチド生産を検討した。実施例 5 で用いたものと同じ酵素画分 $2\mu\text{l}$ を、表 13 に示す 100mM のカルボキシ成分、表 13 に示す 150mM のアミン成分、 10mM の EDTA を含む $100\mu\text{l}$ のホウ酸緩衝液 ($\text{pH} 9.0$) に加え、 25°C にて 3 時間反応した。この反応で生成した各種ペプチドの生産量を表 13 に示した。この結果、本酵素はジペプチド生産のみならず、アミン成分としてペプチドを用いることにより、鎖長の長いペプチドも生産できることが明らかとなった。

【0106】

以上実施例 9～20 に示されるように、エンペドバクター ブレビス FERMBP-8113 株から得られた本酵素が、極めて基質特異性の広い酵素であることが判明した。

【0107】

【表 13】

カルボキシ成分	アミン成分	生成ペプチド (mM)	
L-Ala-OMe	L-Ala	L-Ala-L-Ala	28.7
	L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala	57.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	44.5
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	34.8
	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala	1.4*
	L-Ala-L-Gln	L-Ala-L-Ala-L-Gln	15.2
	Gly-L-Ala	L-Ala-Gly-L-Ala	25.9
	Gly-Gly	L-Ala-Gly-Gly	41.7
	L-His-L-Ala	L-Ala-L-His-L-Ala	55.9
	L-Leu-L-Ala	L-Ala-L-Leu-L-Ala	48.3
	L-Phe-L-Ala	L-Ala-L-Phe-L-Ala	49.7
	L-Phe-Gly	L-Ala-L-Phe-Gly	43.7
Gly-OMe	L-Ala-L-Tyr	Gly-L-Ala-L-Tyr	1.7
	Gly-L-Gln	Gly-Gly-L-Gln	7.2
	Gly-L-Tyr-L-Ala	Gly-Gly-L-Tyr-L-Ala	44.2
L-Thr-OMe	Gly-Gly	L-Thr-Gly-Gly	83.0

(* L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala-L-Ala の溶解度が低かったので、この系ではカルボキシ成分 10 mM、アミン成分 15 mM の濃度を用いた。他の条件は実施例の説明と同じ)

【0108】

(実施例 20) 既存酵素とのペプチド生成触媒能力の比較

本酵素のペプチド生成能力を既存酵素と比較した。既存酵素としては、EP 278 787A1記載のカルボキシペプチダーゼ Y、EP 359399B1記載のチオールエンドペプチダーゼ (フィシン、パパイン、ブロメライン、キモパパイン) を用い、これらについては、シグマ社製の精製酵素を使用した。本酵素源としては実施例 3 で均一に精製した酵素を使用した。これら酵素は、タンパク量として表 14 に示す量

を反応系に添加した。反応は、100 mM L-アラニンメチルエステルと200 mM L-グルタミンを含む100 μ lのホウ酸緩衝液(pH 9.0)に加え、25℃にて反応した。尚、カルボキシペプチダーゼは、1 mMのEDTAを含む10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)で溶解した酵素、チオールエンドペプチダーゼは、2 mM EDTA、0.1 M KCl、5 mM ジチオスレイトールを含む10 mM酢酸緩衝液(pH 5.0)で溶解した酵素を用いた。これら酵素によるL-アラニル-L-グルタミンの生成速度比を表14に示した。

【0109】

この結果、酵素無添加でも、ごく微量のL-アラニル-L-グルタミン生成が観察され、カルボキシペプチダーゼあるいはチオールエンドペプチダーゼ添加区では、酵素無添加区に比し若干生成速度速まることが観察された。これに対して、本酵素の添加区では圧倒的に速いL-アラニル-L-グルタミン生成速度が観察され、その速度は、カルボキシペプチダーゼY、チオールエンドペプチダーゼに対して、約5,000倍～100,000倍であった。以上のように、本酵素は、今までに例のない極めて速いペプチド生成速度を有していることが判明した。尚、本酵素の分子量は75000のダイマーであるのに対し、カルボキシペプチダーゼYの分子量は約61000、上記チオールエンドペプチダーゼの分子量は約23000～36000と報告されているので、分子量当たりのL-アラニル-L-グルタミン生成速度は、実施例に示した単位重量当たりよりも更に本酵素の方が速くなる。

【0110】

【表 14】

酵素	添加酵素量 (タンパク mg/ml)	L-Ala-L-Gln 生成 速度 (mM/分)	酵素単位重量当 りの L-Ala-L-Gln 生成速度比
酵素なし	0	0.0006	
カルボキシペプチ ダーゼ Y	0.61	0.0257	0.0191
フィシン	2.60	0.0096	0.0017
パパイ	2.30	0.0106	0.0021
ブロメラ	2.80	0.0062	0.0010
キモパ	3.60	0.0100	0.0013
本発明酵素	0.02	4.4000	100.0

【0111】

(実施例 21) エンペドバクター ブレビス由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 を用いた。遺伝子の単離にはエシエリヒア コリ (Escherichia coli) JM-109 を宿主に用い、ベクターは pUC118 を用いた。

【0112】

(1) 決定内部アミノ酸配列に基づいた PCR プライマーの作製

前述のエンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株由来のペプチド生成酵素のリジルエンドペプチダーゼによる消化物をエドマン分解法により決定したアミノ酸配列 (配列番号 1 及び 2) をもとに、配列番号 3 及び 4 にそれぞれ示す塩基配列を有するミックスプライマーを作成した。

【0113】

(2) 菌体の取得

エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113 株を CM2G 寒天培地 (50 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキス、10 g/l ペプトン、5 g

／1 塩化ナトリウム、20 g／l 寒天、pH 7.0)) 上で30℃、24時間培養した。この菌体を、50 ml のCM2 G液体培地（上記培地より寒天を除いた培地）を張り込んだ500 ml の坂口フラスコに1白金耳植菌し、30℃で振盪培養した。

【0114】

(3) 菌体からの染色体DNAの取得

培養液50mlを遠心分離 (12,000 rpm、4℃、15分間) し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen社) を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体DNAを取得した。

【0115】

(4) PCR法によるペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片の取得
エンペドバクター ブレビスFERM BP-8113株由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株から取得した染色体DNAに対し、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。

【0116】

PCR反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL（宝酒造製）を用いて行い、以下の条件の反応を30サイクル行った。

94℃ 30秒

52℃ 1分

72℃ 1分

反応後、反応液3 µlを0.8%アガロース電気泳動に供した。その結果、約1.5 kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。

【0117】

(5) 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd editi

on, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0 1 1 8】

上記PCRで増幅された約1.5 kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0 1 1 9】

本実施例21(3)で取得したエンペドバクター ブレビスの染色体DNAを制限酵素HindIIIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製)にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを50℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1%SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1%SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0 1 2 0】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約4 kbのバンドが検出できた。

【0 1 2 1】

本実施例21(3)で調製した染色体DNA 5 μ gをHindIIIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約4 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製)を用いてDNAを精製し、10 μ lのTEに溶解した。このうち4 μ lと、pUC118 HindIII/BAP (宝酒造製)とを混合し、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製)を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 μ lとEscherichia coli JM109のコンピテント・セル (東洋紡績製) 1

0 0 μ lとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

【0 1 2 2】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0 1 2 3】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製)に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、50℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む2×SSCで室温、20分間洗浄した。さらに0.1% SDSを含む0.1×SSCで65℃、15分間洗浄を2回行った。

【0 1 2 4】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを2株確認できた。

【0 1 2 5】

(6) エンペドバクター ブレビス由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列
標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記2菌株から、エシェリヒア コリ JM109が保有するプラスミドを、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (プロメガ社製)を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTCS-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0126】

その結果、ペプチド生成酵素の内部アミノ酸配列（配列番号1及び2）を含むタンパク質をコードするオープンリーディングフレームが存在し、ペプチド生成酵素をコードする遺伝子であることを確認した。ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号5に示した。得られたオープンリーディングフレームをBLASTP. プログラムで相同性解析した結果、二つの酵素に相同性が見出され、Acetobacter pasteurianusの α -アミノ酸エステルハイドロラーゼ (Appl. Environ. Microbiol., 68(1), 211-218(2002)) とは、アミノ酸配列で34%、Brevibacillus laterosporum (J. Bacteriol., 173(24), 7848-7855(1991)) のグルタリル-7ACAアシラーゼとは、アミノ酸配列で26%の相同性を示した。

【0127】

（実施例22）エンペドバクター属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

エシェリヒア コリ (Escherichia coli) W3110 染色体DNA上の *trp* オペロンのプロモーター領域を配列番号7, 8に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子領域を増幅し、得られたDNA断片をpGEM-Teasyベクター（プロメガ製）にライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から *trp* プロモーターの方向が *lac* プロモーターと反対向きに挿入された目的のプラスミドを有する株を選択した。次にこのプラスミドをEcoO109I/EcoRIにて処理して得られる *trp* プロモーターを含むDNA断片と、pUC19 (Takara製) のEcoO109I/EcoRI処理物とライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択した。次にこのプラスミドをHindIII/PvuIIにて処理して得られるDNA断片と、pKK223-3 (Amersham Pharmacia製) をHindIII/HincIIにて処理し、得られた *rrnB* ターミネーターを含むDNA断片とをライゲーションした。このライゲーション溶液でE. coli JM

109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpTと命名した。

【0128】

エンペドバクター プレビス FERM BP-8113の染色体DNAを鋳型として配列番号9, 10に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をNdeI/PstIにて処理し、得られたDNA断片とpTrpTのNdeI/PstI処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpT_Gtg2と命名した。

【0129】

pTrpT_Gtg2を有するエシェリヒア コリ JM109を100mg/lアンピシリンを含むLB培地で、30℃、24時間シード培養した。得られた培養液1mlを、50mlの培地(2g/l D-グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ500ml坂口フラスコにシードし、25℃、24時間の本培養を行った。培養液1mlあたり0.44UのL-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がE. coliで発現したことを確認した。なお、対照としてpTrpTのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0130】

(実施例23) スフィンゴバクテリウム エスピー の菌体を用いるL-アラニル-L-グルタミンの生産

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株の培養には、1L中にグルコース 5g、硫酸アンモニウム 5g、リン酸一カリウム 1g、リン酸二カリウム 3g、硫酸マグネシウム 0.5g、酵母エキス 10g、ペプトン 10gを含む培地(pH7.0)50mLを500mL坂口フラスコに分注し、115℃で15分殺菌したものを用いた。これに1L中にグルコース 5g、

酵母エキス 10 g、ペプトン 10 g、NaCl 5 gを含む斜面寒天培地（寒天 20 g/L、pH 7.0）にて30℃、24時間培養したスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株を1白金耳接種し、30℃、120往復/分、で20時間振とう培養を行った。この培養液1mlを上記培地（50ml/500mL坂口フラスコ）に添加し、30℃、18時間培養した。培養終了後、これらの培養液から菌体を遠心分離し、湿菌体として100 g/Lになるように10 mMのEDTAを含む0.1 Mホウ酸緩衝液（pH 9.0）にて懸濁した。この菌体懸濁液0.1 mLに、EDTA 10 mM、L-アラニンメチルエステル塩酸塩 200 mM、及びL-グルタミン 400 mMを含む100 mMホウ酸緩衝液（pH 9.0）0.1 mLを添加し、全量を0.2 mLとした後、25℃にて120分反応をおこなった。このときのL-アラニン-L-グルタミンの生成量は62 mMであった。

【0131】

（実施例24）スフィンゴバクテリウム エスピーからの酵素の精製

以下、遠心分離以降の操作は氷上あるいは4℃にて行った。実施例23と同様に、スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124株を培養し、遠心分離（10,000 rpm, 15分）によって菌体を集めた。菌体2 gを20 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）にて洗浄後、同緩衝液8 mlに懸濁し、195 Wにて45分間超音波破碎処理を行った。この超音波破碎液を遠心分離（10,000 rpm, 30分）し、破碎菌体片を除去することにより超音波破碎液上清を得た。この超音波破碎液上清を20 mMトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）に対して一夜透析し、超遠心分離（50,000 rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として可溶性画分を得た。得られた可溶性画分をトリス-塩酸緩衝液（pH 7.6）にて予め平衡化したQ-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、非吸着画分から活性画分を集めた。この活性画分を20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）に対して一夜透析し、遠心分離（10,000 rpm, 30分）にて不溶性画分を除去することにより、上清液として透析画分を得た。この透析画分を20 mM酢酸緩衝液（pH 5.0）で予め平衡化したSP-Sepharose HPカラム（アマシャム社製）に供し、0～1 M NaClを含む同緩衝液の直線的な濃度勾

配で酵素を溶出させた活性画分を得た。

【0132】

(実施例 25) 酵素画分を用いた L-アラニル-L-グルタミンの生産

実施例 24 で精製した SP-Sepharose HP 画分 (約 27 U/ml) 10 μ l を、11 mM の L-アラニンメチルエステル塩酸塩、222 mM の L-グルタミン、11 mM の EDTA を含む 90 μ l のホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に加え、25℃にて 120 分反応した。この結果、酵素添加区では、73 mM の L-アラニル-L-グルタミンが生成した。一方、酵素無添加区での L-Ala-L-Gln 生成はほとんど認められず、反応 120 分で 0.07 mM 程度であった。

【0133】

(実施例 26) スフィンゴバクテリウム エスピー由来のペプチド生成酵素遺伝子の単離

以下、ペプチド生成酵素遺伝子の単離について述べるが、微生物はスフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 株を用いた。遺伝子の単離にはエシェリヒア コリ (*Escherichia coli*) DH5 α を宿主に用い、ベクターは pUC118 を用いた。

【0134】

(1) 菌体の取得

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124 株を CM2G 寒天培地 (50 g/l グルコース、10 g/l 酵母エキス、10 g/l ペプトン、5 g/l 塩化ナトリウム、20 g/l 寒天、pH 7.0) 上で 25℃、24 時間培養した。この菌体を、50 ml の CM2G 液体培地 (上記培地より寒天を除いた培地) を張り込んだ 500 ml の坂口フラスコに 1 白金耳植菌し、25℃で振盪培養した。

【0135】

(2) 菌体からの染色体 DNA の取得

培養液 50 ml を遠心分離 (12,000 rpm、4℃、15 分間) し、集菌した。QIAGEN Genomic-tip System (Qiagen 社) を用いて、説明書の方法に基づき、この菌体から染色体 DNA を取得した。

【0136】

(3) PCR法によるプローブ用DNA断片の取得

エンペドバクター ブレビス FERM BP-8113株由来のペプチド生成酵素遺伝子の一部を含むDNA断片を、LA-Taq（宝酒造社製）を用いたPCR法により取得した。エンペドバクター ブレビス FERMBP-8113株から取得した染色体DNAに対し、配列番号3及び4に示す塩基配列を有するプライマーを使用してPCR反応を行った。

【0137】

PCR反応は、Takara PCR Thermal Cycler PERSONAL（宝酒造製）を用いて行い、以下の条件の反応を30サイクル行った。

94℃ 30秒

52℃ 1分

72℃ 1分

反応後、反応液3 μ lを0.8%アガロース電気泳動に供した。その結果、約1.5kbのDNA断片が増幅されていることが確認された。

【0138】

(4) 遺伝子ライブラリーからのペプチド生成酵素遺伝子のクローニング

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、まず、上記PCRにおいて増幅されたDNA断片をプローブとして用いたサザンハイブリダイゼーションを行った。サザンハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0139】

上記PCRで増幅された約1.5kb DNA断片を、0.8%アガロース電気泳動により分離した。目的のバンドを切り出し、精製した。このDNA断片をDIG High Prime（ベリンガー・マンハイム社製）を使用して、説明書に基づきプローブのジゴキシニゲンによる標識を行った。

【0140】

本実施例23(2)で取得したスフィンゴバクテリウム エスピーの染色体DNAを制限酵素SacIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、0.8%

アガロースゲルで電気泳動した。電気泳動後のアガロースゲルからナイロンメンブレンフィルターNylon membranes positively charged (ロシュ・ダイアグノティクス社製) にブロッティングし、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製) を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記で作製した、ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0141】

プローブとハイブリダイズするバンドの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製) を使用して、説明書に基づき行った。その結果、プローブとハイブリダイズする約3 kbのバンドが検出できた。

【0142】

本実施例23(2)で調製した染色体DNA 5 µgをSacIで完全に消化した。0.8%アガロースゲル電気泳動により約3 kbのDNAを分離し、Gene Clean II Kit (フナコシ社製) を用いてDNAを精製し、10 µlのTEに溶解した。このうち4 µlと、SacIで37℃、16時間反応させて完全に消化した後、Alkaline Phosphatase (E.coli C75) で37℃、30分、50℃、30分処理したpUC118とを混合し、DNA Ligation Kit Ver.2 (宝酒造製) を用いて連結反応を行った。このライゲーション反応液5 µlとEscherichia coli DH5αのコンピテント・セル (宝酒造社製) 100 µlとを混合して、Escherichia coliを形質転換した。これを適当な固形培地に塗布し、染色体DNAライブラリーを作製した。

【0143】

ペプチド生成酵素遺伝子全長を取得するために、上記プローブを用いたコロニーハイブリダイゼーションによる染色体DNAライブラリーのスクリーニングを行った。コロニーハイブリダイゼーションの操作は、Molecular Cloning, 2nd edition, Cold Spring Harbor press(1989)に説明されている。

【0144】

染色体DNAライブラリーのコロニーをナイロンメンブレンフィルターNylon Membranes for Colony and Plaque Hybridization (ロシュ・ダイアグノティクス社製)に移し、アルカリ変性、中和、固定化の処理を行った。ハイブリダイゼーションはEASY HYB (ベーリンガー・マンハイム社製)を用いて行った。フィルターを37℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、上記ジゴキシニゲンによる標識プローブを添加し、37℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。この後、フィルターを0.1% SDSを含む1×SSCで60℃で洗浄を2回行った。

【0145】

標識プローブとハイブリダイズするコロニーの検出は、DIG Nucleotide Detection Kit (ベーリンガー・マンハイム社製)を使用して、説明書に基づき行った。その結果、標識プローブとハイブリダイズするコロニーを6株確認できた。

【0146】

(5) スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子の塩基配列

標識プローブとハイブリダイズしたことが確認された上記6菌株から、エシェリヒア コリ DH5 α が保有するプラスミドを、Wizard Plus Minipreps DNA Purification System (プロメガ社製)を用いて調製し、プローブとハイブリダイズした近傍の塩基配列を決定した。シーケンス反応はCEQ DTCS-Quick Start Kit (ベックマン・コールター社製)を用いて、説明書に基づき行った。また、電気泳動はCEQ 2000-XL (ベックマン・コールター社製)を用いて行った。

【0147】

その結果、ペプチド生成酵素をコードするオープンリーディングフレームが存在した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素遺伝子全長の塩基配列とこれに対応するアミノ酸配列を配列表配列番号11に示した。スフィンゴバクテリウム エスピー由来ペプチド生成酵素は、エンペドバクターブレビス由来ペプチド生成酵素とアミノ酸配列で63.5%の相同性を示した(BLASTPプログラムを使用)。

【0148】

(実施例 27) スフィンゴバクテリウム属由来のペプチド生成酵素遺伝子の大腸菌における発現

スフィンゴバクテリウム エスピー FERM BP-8124の染色体DNAを鋳型として配列番号13、14に示すオリゴヌクレオチドをプライマーとしてPCRにより目的遺伝子を増幅した。このDNA断片をNde I/Xba Iにて処理し、得られたDNA断片とpTrpTのNde I/Xba I処理物をライゲーションした。このライゲーション溶液でエシェリヒア コリ JM109を形質転換し、アンピシリン耐性株の中から目的のプラスミドを有する株を選択し、このプラスミドをpTrpT__Sm__aetと命名した。

【0149】

pTrpT__Sm__aetを有するエシェリヒア コリ JM109を3mlの培地(2g/l グルコース、10g/l 酵母エキス、10g/l カザミノ酸、5g/l 硫酸アンモニウム、3g/l リン酸二水素カリウム、1g/l リン酸水素二カリウム、0.5g/l 硫酸マグネシウム七水和物、100mg/l アンピシリン)を張り込んだ普通試験管に一白金耳植菌し、25℃、20時間の本培養を行った。培養液1mlあたり2.1UのL-アラニル-L-グルタミン生成活性を有しており、クローニングした遺伝子がエシェリヒア コリで発現したことを確認した。なお、対照としてpTrpTのみを導入した形質転換体には、活性は検出されなかった。

【0150】

【発明の効果】

本発明により、酵素を用いて簡便にトリペプチドを生成することができる。本発明の方法により、保護基の導入・脱離などの複雑な合成方法を軽減し、簡便かつ高収率で安価にペトリペプチド以上のペプチドを製造することができる。

【0151】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> 味の素株式会社 (AJINOMOTO CO., INC.)

<120> トリペプチド以上のペプチドの製造方法

<130> PAMA-14175

<160> 14

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 9

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<400> 1

Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys

1

5

<210> 2

<211> 9

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<400> 2

Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp

1

5

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer 1

<400> 3

ttyacngcna thtaycarcc

20

<210> 4

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer 2

<400> 4

tcnggcatng trtangtnac rtt

23

<210> 5

<211> 2024

<212> DNA

<213> Empedobacter brevis

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(1908)

<223> gene coding peptide synthase

<400> 5

atttcttaat aaaaactgaa atcttaatac atttatacta tcgtaaaatt tattgaacac 60

gtg aaa aaa tta aca tta aaa gta act cta ctt aca ctt ttg ttg gga 108

Val Lys Lys Leu Thr Leu Lys Val Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Gly

1

5

10

15

agt aca gtt gga ttt gcg caa gat gca aaa gca gat tct gct tat gtg 156

Ser Thr Val Gly Phe Ala Gln Asp Ala Lys Ala Asp Ser Ala Tyr Val

20

25

30

cgc gac aat tac gaa aaa ata gaa caa gta att ccg atg cgc gat ggt 204

Arg Asp Asn Tyr Glu Lys Ile Glu Gln Val Ile Pro Met Arg Asp Gly

35

40

45

aca aag tta ttt aca gct att tat cag cca aaa gat aaa aca aaa caa 252

Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys Asp Lys Thr Lys Gln

50

55

60

tat ccc gtt ttg tta aat cgt acg cct tat aca gtt gcg cct tat ggt 300

Tyr Pro Val Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ala Pro Tyr Gly

65

70

75

80

gta aat gaa tac aag aaa tcg tta gga aat ttt cct aca gaa atg cgc 348

Val Asn Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Thr Glu Met Arg

85

90

95

gaa ggt ttt att ttt gtt tac caa gat gtg aga gga aaa tgg atg agc 396

Glu Gly Phe Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser

100

105

110

gaa ggc gaa ttt gaa gat gtt cga cct ata aat cct tca aaa agt aaa 444

Glu Gly Glu Phe Glu Asp Val Arg Pro Ile Asn Pro Ser Lys Ser Lys

115

120

125

aag gca att gac gaa agc aca gat aca ttt gat acg cta gaa tgg ctt 492

Lys Ala Ile Asp Glu Ser Thr Asp Thr Phe Asp Thr Leu Glu Trp Leu

130

135

140

gct aaa aac ttg aag aat tac acg aaa aaa gct gga att tat gga att 540

Ala Lys Asn Leu Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Gly Ile Tyr Gly Ile

145

150

155

160

tcg tat cct ggt ttt tat tcg aca atg agt ttg gtt aat tcg cat cca 588

Ser Tyr Pro Gly Phe Tyr Ser Thr Met Ser Leu Val Asn Ser His Pro

165

170

175

act cta aaa gcc gtt tcg cca caa gcg ccc gtt acc aat tgg ttt tta 636

Thr Leu Lys Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asn Trp Phe Leu

180

185

190

ggt gac gat ttt cat cat aat gga gtt tta ttc ttg aat gat tct ttc 684

Gly Asp Asp Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Asn Asp Ser Phe

195

200

205

tca ttt atg act ttt ttt ggt gta aaa cgt ccg caa cca att acg cca 732

Ser Phe Met Thr Phe Phe Gly Val Lys Arg Pro Gln Pro Ile Thr Pro

210

215

220

gat aaa ggt ccg aaa cgt ttt gaa tat cca ata aaa gat aat tat aga 780

Asp Lys Gly Pro Lys Arg Phe Glu Tyr Pro Ile Lys Asp Asn Tyr Arg

225

230

235

240

ttt tat gca agt ggc tct gta aaa gag ttg aaa gat aaa tat ttg caa 828

Phe Tyr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Lys Tyr Leu Gln

245

250

255

gat aat atc aag ttt tac aat gat tta ttt gcg cat cca gat tac gat 876

Asp Asn Ile Lys Phe Tyr Asn Asp Leu Phe Ala His Pro Asp Tyr Asp

260

265

270

caa ttt tgg caa gat cgt aat gtt tta cca cat tta act aac gtg caa 924

Gln Phe Trp Gln Asp Arg Asn Val Leu Pro His Leu Thr Asn Val Gln

275

280

285

cct gct gta atg acg gtt gga ggt ttt ttt gat gca gaa gat gtc tac 972

Pro Ala Val Met Thr Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Val Tyr

290

295

300

ggc gct ttc gaa acg tat aaa gca att gag aaa caa aat ccg aaa gca 1020

Gly Ala Phe Glu Thr Tyr Lys Ala Ile Glu Lys Gln Asn Pro Lys Ala
 305 310 315 320

aca aat att atg gtt gcc gga cct tgg ttt cat ggt ggt tgg gtt cgt 1068
 Thr Asn Ile Met Val Ala Gly Pro Trp Phe His Gly Gly Trp Val Arg
 325 330 335

agc aac gga agt act ttt gga gat atg caa ttt gca tcg aat aca agt 1116
 Ser Asn Gly Ser Thr Phe Gly Asp Met Gln Phe Ala Ser Asn Thr Ser
 340 345 350

gag cat tat cag caa gaa ata gaa ttg cct ttt ttt aat tat tac tta 1164
 Glu His Tyr Gln Gln Glu Ile Glu Leu Pro Phe Phe Asn Tyr Tyr Leu
 355 360 365

aaa gat aaa ggt aat ttt aaa cca acc gaa gct aca att ttt att acg 1212
 Lys Asp Lys Gly Asn Phe Lys Pro Thr Glu Ala Thr Ile Phe Ile Thr
 370 375 380

gga tct aac gaa tgg aaa caa ttt gat gct tgg cca cca aaa aat gta 1260
 Gly Ser Asn Glu Trp Lys Gln Phe Asp Ala Trp Pro Pro Lys Asn Val
 385 390 395 400

aca aca caa aaa att tat ttg caa caa aat ggt aaa ata gct ttt aat 1308
 Thr Thr Gln Lys Ile Tyr Leu Gln Gln Asn Gly Lys Ile Ala Phe Asn
 405 410 415

aaa acc aat aca aca act act ttt gac gaa tat gtt gca gat cca aat 1356
 Lys Thr Asn Thr Thr Thr Thr Phe Asp Glu Tyr Val Ala Asp Pro Asn

420	425	430
tct cca gtt cct tat tca gga gga gtt tta gaa act cgt tca aga gaa	1404	
Ser Pro Val Pro Tyr Ser Gly Gly Val Leu Glu Thr Arg Ser Arg Glu		
435	440	445
tat atg gtc gat gat caa cgc ttt gct tct act cgt cct gat gtt atg	1452	
Tyr Met Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ser Thr Arg Pro Asp Val Met		
450	455	460
gtg tat caa tct gat att ttg aca gaa gat att acg ctt gct ggt cct	1500	
Val Tyr Gln Ser Asp Ile Leu Thr Glu Asp Ile Thr Leu Ala Gly Pro		
465	470	475
480		
gtt atc aat cat tta gtg gtt tct act acg gga aca gac gct gat tat	1548	
Val Ile Asn His Leu Val Val Ser Thr Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr		
485	490	495
gtt gta aaa ttg att gat gtt tat cct gaa aac acg cca aaa ttt aat	1596	
Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Glu Asn Thr Pro Lys Phe Asn		
500	505	510
aac aaa tta atg gct gga tat caa aat ttg att cgt gca gaa att atg	1644	
Asn Lys Leu Met Ala Gly Tyr Gln Asn Leu Ile Arg Ala Glu Ile Met		
515	520	525
cgc gga aaa tat aga aat agt ttc tct aac ccc gaa gct atg gtt ccg	1692	
Arg Gly Lys Tyr Arg Asn Ser Phe Ser Asn Pro Glu Ala Met Val Pro		
530	535	540

aat aaa gaa aca aat gta acg tac acg atg cca gat gtt gga cat aca 1740

Asn Lys Glu Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp Val Gly His Thr

545 550 555 560

ttt aag aaa gga cat cgc att atg att caa gtt cag aac agt tgg ttt 1788

Phe Lys Lys Gly His Arg Ile Met Ile Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe

565 570 575

cct tta gca gat cgc aat ccg caa caa ttt atg aat gtt tac gaa gca 1836

Pro Leu Ala Asp Arg Asn Pro Gln Gln Phe Met Asn Val Tyr Glu Ala

580 585 590

act tct aaa gat tat tta aaa caa acg caa cga att tat cat act tct 1884

Thr Ser Lys Asp Tyr Leu Lys Gln Thr Gln Arg Ile Tyr His Thr Ser

595 600 605

tat atc gaa att ccg gta ttg aaa taacaaaaaa atccagctaa ttagctggat 1938

Tyr Ile Glu Ile Pro Val Leu Lys

610 615

tttttttata atgttacttt tcctatTTTT cctttatttc caactaaaat tacatatttt 1998

ttatcgggCG aaaccgtaca agtatg

2024

<210> 6

<211> 616

<212> PRT

<213> Empedobacter brevis

<400> 6

Val Lys Lys Leu Thr Leu Lys Val Thr Leu Leu Thr Leu Leu Leu Gly

1 5 10 15

Ser Thr Val Gly Phe Ala Gln Asp Ala Lys Ala Asp Ser Ala Tyr Val

20 25 30

Arg Asp Asn Tyr Glu Lys Ile Glu Gln Val Ile Pro Met Arg Asp Gly

35 40 45

Thr Lys Leu Phe Thr Ala Ile Tyr Gln Pro Lys Asp Lys Thr Lys Gln

50 55 60

Tyr Pro Val Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ala Pro Tyr Gly

65 70 75 80

Val Asn Glu Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Thr Glu Met Arg

85 90 95

Glu Gly Phe Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser

100 105 110

Glu Gly Glu Phe Glu Asp Val Arg Pro Ile Asn Pro Ser Lys Ser Lys

115 120 125

Lys Ala Ile Asp Glu Ser Thr Asp Thr Phe Asp Thr Leu Glu Trp Leu

130 135 140

Ala Lys Asn Leu Lys Asn Tyr Thr Lys Lys Ala Gly Ile Tyr Gly Ile
145 150 155 160

Ser Tyr Pro Gly Phe Tyr Ser Thr Met Ser Leu Val Asn Ser His Pro
165 170 175

Thr Leu Lys Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asn Trp Phe Leu
180 185 190

Gly Asp Asp Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Asn Asp Ser Phe
195 200 205

Ser Phe Met Thr Phe Phe Gly Val Lys Arg Pro Gln Pro Ile Thr Pro
210 215 220

Asp Lys Gly Pro Lys Arg Phe Glu Tyr Pro Ile Lys Asp Asn Tyr Arg
225 230 235 240

Phe Tyr Ala Ser Gly Ser Val Lys Glu Leu Lys Asp Lys Tyr Leu Gln
245 250 255

Asp Asn Ile Lys Phe Tyr Asn Asp Leu Phe Ala His Pro Asp Tyr Asp
260 265 270

Gln Phe Trp Gln Asp Arg Asn Val Leu Pro His Leu Thr Asn Val Gln
275 280 285

Pro Ala Val Met Thr Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Val Tyr

出証特 2 0 0 4 - 3 0 0 1 7 7 8

Tyr Met Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ser Thr Arg Pro Asp Val Met
450 455 460

Val Tyr Gln Ser Asp Ile Leu Thr Glu Asp Ile Thr Leu Ala Gly Pro
465 470 475 480

Val Ile Asn His Leu Val Val Ser Thr Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr
485 490 495

Val Val Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Glu Asn Thr Pro Lys Phe Asn
500 505 510

Asn Lys Leu Met Ala Gly Tyr Gln Asn Leu Ile Arg Ala Glu Ile Met
515 520 525

Arg Gly Lys Tyr Arg Asn Ser Phe Ser Asn Pro Glu Ala Met Val Pro
530 535 540

Asn Lys Glu Thr Asn Val Thr Tyr Thr Met Pro Asp Val Gly His Thr
545 550 555 560

Phe Lys Lys Gly His Arg Ile Met Ile Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe
565 570 575

Pro Leu Ala Asp Arg Asn Pro Gln Gln Phe Met Asn Val Tyr Glu Ala
580 585 590

Thr Ser Lys Asp Tyr Leu Lys Gln Thr Gln Arg Ile Tyr His Thr Ser
595 600 605

Tyr Ile Glu Ile Pro Val Leu Lys

610

615

<210> 7

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT

<400> 7

gtatcacgag gccctagctg tgggtgcatg gtcggtgatc

40

<210> 8

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT

<400> 8

ttcggggatt ccatatgata ccctttttac gtgaacttgc

40

<210> 9

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthrsized
primer for preparation of pTrpT_Gtg2

<400> 9

gggaattcca tatgaaaaaa ttaacattaa aagtaact

38

<210> 10

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT_Gtg2

<400> 10

gggggctgca gtacttgtac ggtttcgccc gataaa

36

<210> 11

<211> 1935

<212> DNA

<213> Sphingobacterium sp.

<220>

<221> CDS

<222> (61)..(1917)

<223> gene of peptide synthase

<400> 11

gaaaccaagt gtaaaattat aatttacacc aaagaatgta ctgaacaaat aattatctga 60

atg aaa aat aca att tcg tgc cta act tta gcg ctt tta agc gca agc 108

Met Lys Asn Thr Ile Ser Cys Leu Thr Leu Ala Leu Leu Ser Ala Ser

1 5 10 15

cag tta cat gct caa aca gct gcc gac tcg gct tat gtt aga gat cat 156

Gln Leu His Ala Gln Thr Ala Ala Asp Ser Ala Tyr Val Arg Asp His

20 25 30

tat gaa aag acc gaa gta gca att ccc atg cga gat ggg aaa aaa tta 204

Tyr Glu Lys Thr Glu Val Ala Ile Pro Met Arg Asp Gly Lys Lys Leu

35 40 45

ttt act gcg atc tac agt cca aaa gac aaa tcc aag aaa tat cca gtt 252

Phe Thr Ala Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Val

50 55 60

ttg ctc aat aga acg ccc tac acg gtt tca cct tat ggg cag aac gaa 300
 Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ser Pro Tyr Gly Gln Asn Glu
 65 70 75 80

tat aaa aaa agc ttg gga aac ttt ccc caa atg atg cgt gaa ggc tat 348
 Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Gln Met Met Arg Glu Gly Tyr
 85 90 95

att ttc gtt tac cag gat gtc cgt ggc aag tgg atg agc gaa ggt gat 396
 Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser Glu Gly Asp
 100 105 110

ttt gaa gat ata cgt ccg acc acg tac agc aaa gat aaa aaa gca atc 444
 Phe Glu Asp Ile Arg Pro Thr Thr Tyr Ser Lys Asp Lys Lys Ala Ile
 115 120 125

gat gaa agt acg gat acc tat gat gcg ctt gaa tgg tta cag aaa aat 492
 Asp Glu Ser Thr Asp Thr Tyr Asp Ala Leu Glu Trp Leu Gln Lys Asn
 130 135 140

ctc aaa aac tat aat ggc aaa gcc ggg ctc tat ggg att tcc tat cca 540
 Leu Lys Asn Tyr Asn Gly Lys Ala Gly Leu Tyr Gly Ile Ser Tyr Pro
 145 150 155 160

ggc ttc tat tct acc gtc gga ttg gtc aaa aca cac ccg agc ttg aag 588
 Gly Phe Tyr Ser Thr Val Gly Leu Val Lys Thr His Pro Ser Leu Lys
 165 170 175

gca gtc tcc cca cag gct ccc gta aca gac tgg tat atc ggc gac gac 636

Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asp Trp Tyr Ile Gly Asp Asp
 180 185 190

ttc cac cat aat ggc gta ttg ttt ctt cag gat gca ttt aca ttc atg 684
 Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Gln Asp Ala Phe Thr Phe Met
 195 200 205

tca acc ttt ggt gtc cct cgt cca aaa ccc att aca ccg gat caa ttt 732
 Ser Thr Phe Gly Val Pro Arg Pro Lys Pro Ile Thr Pro Asp Gln Phe
 210 215 220

aag ggc aaa att cag atc aaa gaa gcc gat aaa tat aac ttt ttt gca 780
 Lys Gly Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ala Asp Lys Tyr Asn Phe Phe Ala
 225 230 235 240

gaa gca gga aca gcg cgg gaa ctc aaa gaa aag tat ttt ggt gac tcc 828
 Glu Ala Gly Thr Ala Arg Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Ser
 245 250 255

gta caa ttt tgg aat gac ctg ttt aag cat ccc gac tat gat gat ttt 876
 Val Gln Phe Trp Asn Asp Leu Phe Lys His Pro Asp Tyr Asp Asp Phe
 260 265 270

tgg aaa tcg cgt gtg atc acg aat tct tta cag gag gta aaa cca gct 924
 Trp Lys Ser Arg Val Ile Thr Asn Ser Leu Gln Glu Val Lys Pro Ala
 275 280 285

gtg atg gtg gtt ggt ggt ttc ttt gac gcg gaa gat gct tat gga aca 972
 Val Met Val Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Ala Tyr Gly Thr

290	295	300	
ttt aag acc tac caa tcg att gag gat aaa agc aaa aaa aac aac tcg 1020			
Phe Lys Thr Tyr Gln Ser Ile Glu Asp Lys Ser Lys Lys Asn Asn Ser			
305	310	315	320
att tta gtc gcg gga cct tgg tat cat ggc ggt tgg gtt cgt gca gaa 1068			
Ile Leu Val Ala Gly Pro Trp Tyr His Gly Gly Trp Val Arg Ala Glu			
	325	330	335
gga aac tat tta ggt gat atc caa ttt gag aaa aaa acc agt att act 1116			
Gly Asn Tyr Leu Gly Asp Ile Gln Phe Glu Lys Lys Thr Ser Ile Thr			
	340	345	350
tat cag gaa caa ttt gaa caa cca ttt ttc aaa tat tac cta aaa gat 1164			
Tyr Gln Glu Gln Phe Glu Gln Pro Phe Phe Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp			
	355	360	365
gaa gga aac ttc gcc cct tcc gaa gct aac att ttt gtt tca ggc agc 1212			
Glu Gly Asn Phe Ala Pro Ser Glu Ala Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser			
370	375	380	
aac gaa tgg aaa cat ttc gaa cag tgg cca cca aaa aat gta gag aca 1260			
Asn Glu Trp Lys His Phe Glu Gln Trp Pro Pro Lys Asn Val Glu Thr			
385	390	395	400
aaa aaa cta tac ttc caa cct cag ggg aaa ctt gga ttt gac aaa gtt 1308			
Lys Lys Leu Tyr Phe Gln Pro Gln Gly Lys Leu Gly Phe Asp Lys Val			
	405	410	415

caa cgt aca gat tcc tgg gat gaa tat gta aca gac cct aat aaa cct 1356

Gln Arg Thr Asp Ser Trp Asp Glu Tyr Val Thr Asp Pro Asn Lys Pro

420

425

430

gtt ccg cat caa ggt ggg gta att caa aac cga aca cgg gag tat atg 1404

Val Pro His Gln Gly Gly Val Ile Gln Asn Arg Thr Arg Glu Tyr Met

435

440

445

gta gat gat caa cgt ttc gcg gct agt cgc cct gat gtc atg gtt tat 1452

Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ala Ser Arg Pro Asp Val Met Val Tyr

450

455

460

caa acg gaa ccg ttg acg gag gac ctg acg ata gta ggc cca atc aaa 1500

Gln Thr Glu Pro Leu Thr Glu Asp Leu Thr Ile Val Gly Pro Ile Lys

465

470

475

480

aac ttt ctc aaa gtt tct tca aca gga aca gac gcg gac tat gtt gtc 1548

Asn Phe Leu Lys Val Ser Ser Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Val Val

485

490

495

aaa ctg att gac gtt tat ccg aat gat gca gca agt tat caa gga aaa 1596

Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asn Asp Ala Ala Ser Tyr Gln Gly Lys

500

505

510

aca atg gct gga tat caa atg atg gta cgt ggt gag atc atg gcg ggg 1644

Thr Met Ala Gly Tyr Gln Met Met Val Arg Gly Glu Ile Met Ala Gly

515

520

525

aaa tac cga aat ggt ttc gat aaa gcg cag gcc ttg act cca ggt atg 1692

Lys Tyr Arg Asn Gly Phe Asp Lys Ala Gln Ala Leu Thr Pro Gly Met

530

535

540

gtc gaa aag gtg aat ttt gaa atg cca gac gtt gcg cat acc ttc aaa 1740

Val Glu Lys Val Asn Phe Glu Met Pro Asp Val Ala His Thr Phe Lys

545

550

555

560

aaa gga cat cgc att atg gtt cag gta caa aac tca tgg ttt ccg ctg 1788

Lys Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe Pro Leu

565

570

575

gca gaa cga aat cca cag gtg ttt tta gca cct tat aca gct acc aaa 1836

Ala Glu Arg Asn Pro Gln Val Phe Leu Ala Pro Tyr Thr Ala Thr Lys

580

585

590

gct gat ttc cgc aaa gct acc caa cgt att ttt cac gat gtg aac aat 1884

Ala Asp Phe Arg Lys Ala Thr Gln Arg Ile Phe His Asp Val Asn Asn

595

600

605

gcc aca tac atc gaa ttt tct gtc ctc aaa gat tagcaggtaa attcgaaa 1935

Ala Thr Tyr Ile Glu Phe Ser Val Leu Lys Asp

610

615

<210> 12

<211> 619

<212> PRT

<213> Sphingobacterium sp.

<400> 12

Met Lys Asn Thr Ile Ser Cys Leu Thr Leu Ala Leu Leu Ser Ala Ser

1 5 10 15

Gln Leu His Ala Gln Thr Ala Ala Asp Ser Ala Tyr Val Arg Asp His

20 25 30

Tyr Glu Lys Thr Glu Val Ala Ile Pro Met Arg Asp Gly Lys Lys Leu

35 40 45

Phe Thr Ala Ile Tyr Ser Pro Lys Asp Lys Ser Lys Lys Tyr Pro Val

50 55 60

Leu Leu Asn Arg Thr Pro Tyr Thr Val Ser Pro Tyr Gly Gln Asn Glu

65 70 75 80

Tyr Lys Lys Ser Leu Gly Asn Phe Pro Gln Met Met Arg Glu Gly Tyr

85 90 95

Ile Phe Val Tyr Gln Asp Val Arg Gly Lys Trp Met Ser Glu Gly Asp

100 105 110

Phe Glu Asp Ile Arg Pro Thr Thr Tyr Ser Lys Asp Lys Lys Ala Ile

115 120 125

Asp Glu Ser Thr Asp Thr Tyr Asp Ala Leu Glu Trp Leu Gln Lys Asn

130 135 140

Leu Lys Asn Tyr Asn Gly Lys Ala Gly Leu Tyr Gly Ile Ser Tyr Pro
145 150 155 160

Gly Phe Tyr Ser Thr Val Gly Leu Val Lys Thr His Pro Ser Leu Lys
165 170 175

Ala Val Ser Pro Gln Ala Pro Val Thr Asp Trp Tyr Ile Gly Asp Asp
180 185 190

Phe His His Asn Gly Val Leu Phe Leu Gln Asp Ala Phe Thr Phe Met
195 200 205

Ser Thr Phe Gly Val Pro Arg Pro Lys Pro Ile Thr Pro Asp Gln Phe
210 215 220

Lys Gly Lys Ile Gln Ile Lys Glu Ala Asp Lys Tyr Asn Phe Phe Ala
225 230 235 240

Glu Ala Gly Thr Ala Arg Glu Leu Lys Glu Lys Tyr Phe Gly Asp Ser
245 250 255

Val Gln Phe Trp Asn Asp Leu Phe Lys His Pro Asp Tyr Asp Asp Phe
260 265 270

Trp Lys Ser Arg Val Ile Thr Asn Ser Leu Gln Glu Val Lys Pro Ala
275 280 285

Val Met Val Val Gly Gly Phe Phe Asp Ala Glu Asp Ala Tyr Gly Thr
290 295 300

Phe Lys Thr Tyr Gln Ser Ile Glu Asp Lys Ser Lys Lys Asn Asn Ser
305 310 315 320

Ile Leu Val Ala Gly Pro Trp Tyr His Gly Gly Trp Val Arg Ala Glu
325 330 335

Gly Asn Tyr Leu Gly Asp Ile Gln Phe Glu Lys Lys Thr Ser Ile Thr
340 345 350

Tyr Gln Glu Gln Phe Glu Gln Pro Phe Phe Lys Tyr Tyr Leu Lys Asp
355 360 365

Glu Gly Asn Phe Ala Pro Ser Glu Ala Asn Ile Phe Val Ser Gly Ser
370 375 380

Asn Glu Trp Lys His Phe Glu Gln Trp Pro Pro Lys Asn Val Glu Thr
385 390 395 400

Lys Lys Leu Tyr Phe Gln Pro Gln Gly Lys Leu Gly Phe Asp Lys Val
405 410 415

Gln Arg Thr Asp Ser Trp Asp Glu Tyr Val Thr Asp Pro Asn Lys Pro
420 425 430

Val Pro His Gln Gly Gly Val Ile Gln Asn Arg Thr Arg Glu Tyr Met
435 440 445

Val Asp Asp Gln Arg Phe Ala Ala Ser Arg Pro Asp Val Met Val Tyr

450 455 460

Gln Thr Glu Pro Leu Thr Glu Asp Leu Thr Ile Val Gly Pro Ile Lys
465 470 475 480

Asn Phe Leu Lys Val Ser Ser Thr Gly Thr Asp Ala Asp Tyr Val Val
 485 490 495

Lys Leu Ile Asp Val Tyr Pro Asn Asp Ala Ala Ser Tyr Gln Gly Lys
 500 505 510

Thr Met Ala Gly Tyr Gln Met Met Val Arg Gly Glu Ile Met Ala Gly
 515 520 525

Lys Tyr Arg Asn Gly Phe Asp Lys Ala Gln Ala Leu Thr Pro Gly Met
 530 535 540

Val Glu Lys Val Asn Phe Glu Met Pro Asp Val Ala His Thr Phe Lys
545 550 555 560

Lys Gly His Arg Ile Met Val Gln Val Gln Asn Ser Trp Phe Pro Leu
 565 570 575

Ala Glu Arg Asn Pro Gln Val Phe Leu Ala Pro Tyr Thr Ala Thr Lys
 580 585 590

Ala Asp Phe Arg Lys Ala Thr Gln Arg Ile Phe His Asp Val Asn Asn
 595 600 605

Ala Thr Tyr Ile Glu Phe Ser Val Leu Lys Asp

610

615

<210> 13

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT_Sm_aet

<400> 13

gggaattcca tatgaaaaat acaatttcgt

30

<210> 14

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:synthesized
primer for preparation of pTrpT_Sm_aet

<400> 14

gctctagact aatctttgag gacagaaaa

29

【図面の簡単な説明】**【図 1】**

本発明のエンペドバクターの酵素の至適 p H を示す図である。

【図 2】

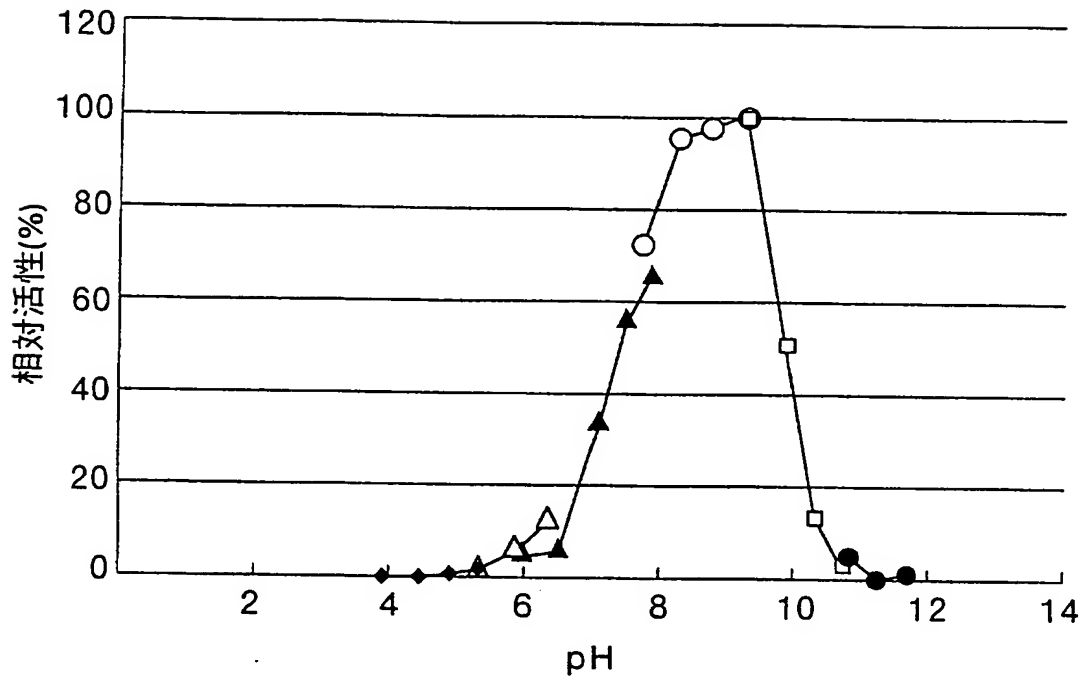
本発明のエンペドバクターの酵素の至適温度を示す図である。

【図 3】

L - アラニンメチルエステルと L - グルタミンからの L - アラニル - L - グルタミン生成の経時変化を示す図である。

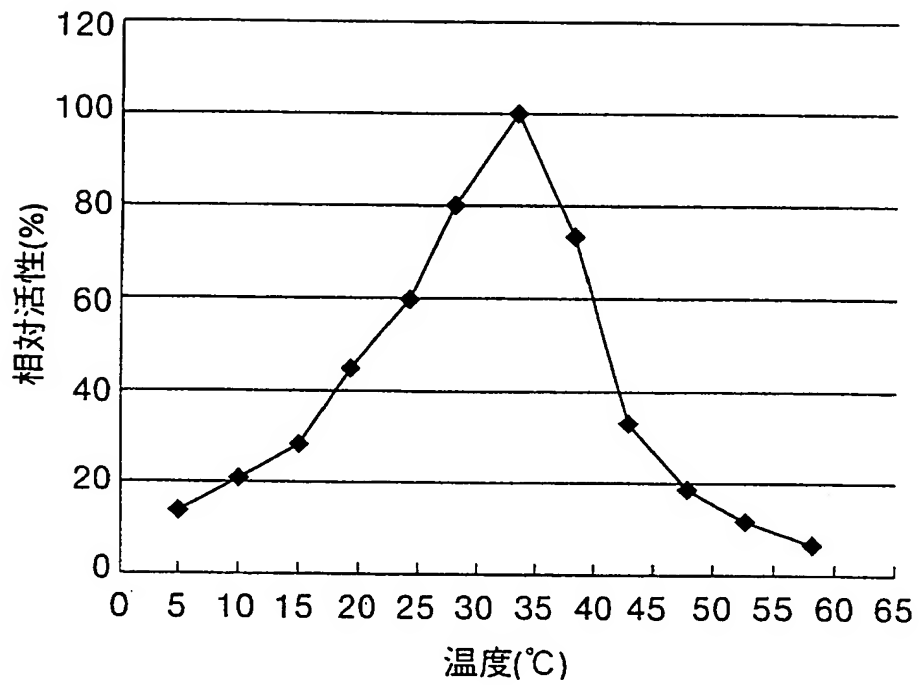
【書類名】 図面

【図 1】

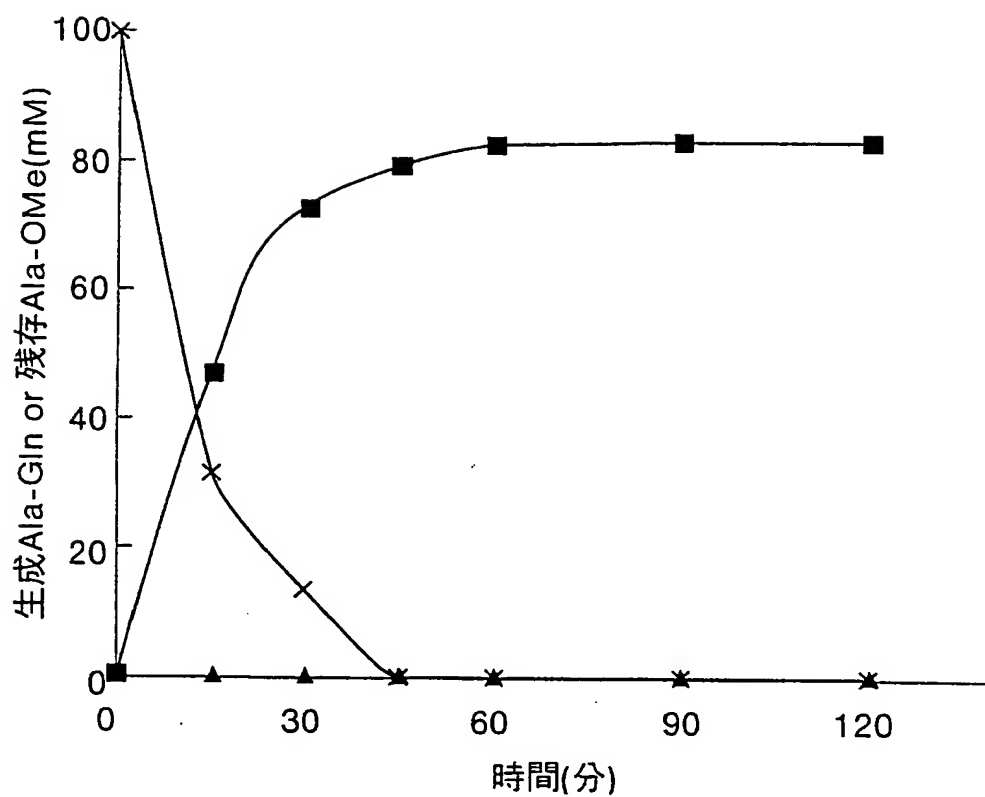


- ◆ : 酢酸緩衝液(pH3.9~5.4)
- △ : MES緩衝液(pH5.4~6.4)
- ▲ : リン酸緩衝液(pH6.0~7.9)
- : ホウ酸緩衝液(pH7.8~9.3)
- : CAPS緩衝液(pH9.3~10.7)
- : K₂HPO₄-NaOH緩衝液(pH10.8~11.6)

【図 2】



【図 3】



- : 酵素添加区での生成L-Ala-L-Gln
× : 酵素添加区での残存L-Ala-OMe
▲ : 酵素無添加区での生成L-Ala-L-Gln

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 本発明は、複雑な合成方法を経ることなく、簡便かつ高収率で安価に、トリペプチド以上のペプチドを製造することができる方法を提供することを課題とする。

【解決手段】 新たに見出したエンペドバクター属に属する細菌からペプチドを効率良く生成する新規酵素を見出し、当該酵素を、カルボキシ成分およびアミン成分に作用させて、トリペプチド以上のペプチドを生成する。

【選択図】 なし

特願 2002-218958

出願人履歴情報

識別番号

[000000066]

1. 変更年月日

1991年 7月 2日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区京橋1丁目15番1号

氏 名

味の素株式会社